Untersuchungen zur Laktatoxidation bei Laktobazillen

Margaretha Hoechst

1979

Untersuchungen zur Laktatoxidation bei Laktobazillen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Margaretha Hoechst
aus
Hallein

Mai 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler
2. Berichterstatter: Priv.Doz.Dr.K.Stetter

Tag der Einreichung der Arbeit: 25.5.1979
Tag der Annahme der Arbeit: 13.7.1979
Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.1979

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite:
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Organismen	6
2.2.	Nährmedien	7
2.3.	Anzucht	8
2.4.	Messung des Wachstums	8
2.5.	Zellernte	8
2.6.	Bestimmung des molaren ökonomischen Koeffizienten	9
2.7.	Zellaufschluß und Herstellung des Rohextraktes	9
2.8.	Manometrische Messungen	1o
2.9.	Reinigung der Radiochemikalien	11
2.1o.	Auftrennung der aus markiertem Laktat gebildeten Produkte	11
2.1o.1.	$^{14}CO_2$	11
2.1o.2.	Auftrennung der löslichen Fraktion	11
2.1o.3.	Identifizierung der Produkte	13
2.1o.3.1.	Säulenchromatographie	13
2.1o.3.2.	Dünnschichtchromatographie	14
2.11.	Bestimmung der Radioaktivität	14
2.12.	Puffer	15
2.13.	Enzymatische Bestimmungsmethoden	15
2.13.1.	Milchsäure	15
2.13.2.	Pyruvat	15
2.13.3.	Glucose	16
2.13.4.	Azetat	16

Seite:

2.14.	Messung der Enzymaktivität	16
2.14.1.	Laktatoxidase	16
2.14.2.	NAD-unabhängige Laktatdehydrogenase...	18
2.14.3.	NAD-abhängige Laktatdehydrogenasen ...	18
2.15.	Proteintest	19
2.16.	Ammonsulfatfällung	19
2.17.	Affinitätschromatographie	2o
2.18.	Aufnahme von Absorptionsspektren	2o
2.19.	Diskelektrophorese	21
2.19.1.	Aktivitätsnachweis der Enzyme im Gel..	21
2.19.1.1.	L-Laktatoxidase	21
2.19.1.2.	Laktatdehydrogenasen	22
2.19.1.2.1.	mit Nitroblautetrazolium und Phenazinmethosulfat als Farbreagenz	22
2.19.1.2.2.	mit 2,6-Dichlorphenolindophenol als Farbreagenz	22
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Verbreitung der Fähigkeit zur Laktatoxidation unter Laktobazillen	23
3.2.	Einfluß von Mangan II auf Milchsäurebildung und Laktatoxidation	28
3.3.	Untersuchung der Azetat- und CO_2-Bildung bei Laktatoxidation durch Laktobazillen	31
3.4.	Untersuchung des Laktatabbaus bei L.curvatus	35
3.4.1.	Stereospezifität der Laktatoxidation...	35
3.4.1.1.	bei Zellen	35
3.4.1.2.	im zellfreien Extrakt	38
3.4.2.	Abbau von ^{14}C-L-Laktat durch Zellsuspensionen von L.curvatus	39
3.4.2.1.	Inkubation unter aeroben Bedingungen...	39
3.4.2.2.	Inkubation unter anaeroben Bedingungen	44

Seite:

3.4.3.	Untersuchungen zur Identifizierung von Zwischenprodukten und beteiligten Enzymen	45
3.4.3.1.	Abbau von ^{14}C-markiertem L-Laktat im zellfreien Extrakt	45
3.4.3.2.	Einfluß von Katalase auf den Laktatabbau	45
3.4.3.3.	Einfluß von Hydroxylamin auf den Laktatumsatz	51
3.4.3.4.	Azetatbildung aus Pyruvat und H_2O_2	52
3.4.3.5.	Abhängigkeit des Laktatabbaus vom Gehalt an endogenen Faktoren des Rohextraktes	55
3.4.3.6.	Nachweis einer L-Laktatoxidase im Rohextrakt von L.curvatus	56
3.4.3.6.1.	Nachweis im optischen Test	56
3.4.3.6.1.1.	Nachweis von H_2O_2-Bildung in Gegenwart von L-Laktat	56
3.4.3.6.1.2.	Abhängigkeit der H_2O_2-Bildung vom O_2-Partialdruck	57
3.4.3.6.1.3.	Bestimmung des Endproduktes	58
3.4.3.6.2.	Nachweis der Laktatoxidase durch Diskelektrophorese	58
3.4.3.7.	Untersuchung der L-Laktatoxidase von L.curvatus	59
3.4.3.7.1.	Vorversuche zur Anreicherung der Laktatoxidase	6o
3.4.3.7.1.1.	Stabilitätsversuche	6o
3.4.3.7.1.1.1.	Art des Puffers und optimaler pH...	6o
3.4.3.7.1.1.2.	Kurzzeitstabilität bei verschiedenen pH-Werten	6o
3.4.3.7.1.1.3.	Variation der Pufferkonzentration..	61
3.4.3.7.1.1.4.	Hitzestabilität	61
3.4.3.7.1.1.5.	Einfluß des O_2-Partialdruckes	61

Seite:

3.4.3.7.1.1.6.	Abhängigkeit der Stabilität von der Verdünnung	62
3.4.3.7.1.1.7.	Stabilität beim Einfrieren	62
3.4.3.7.1.2.	Ammonsulfatfällung	63
3.4.3.7.1.3.	Affinitätschromatographie der Oxidase mit Oxamatsepharose	63
3.4.3.7.1.3.1.	Vorversuche	63
3.4.3.7.1.3.2.	Säulenchromatographie der Oxidase..	63
3.4.3.7.2.	Anreicherung der Laktatoxidase	69
3.4.3.7.2.1.	Kinetische Untersuchungen zur Enzymanreicherung	7o
3.4.3.7.2.1.1.	Abhängigkeit des Gasumsatzes von der Proteinmenge	7o
3.4.3.7.2.1.2.	Untersuchung des Gasaustausches der einzelnen Fraktionen der Anreicherung	74
3.4.3.7.2.2.	Bilanz des Laktatabbaus durch die angereicherte Laktatoxidase	77
3.4.3.7.2.3.	Bestimmung der Michaeliskonstanten für Laktat	78
3,4.3.7.2.4.	Abhängigkeit der Aktivität von der Art des Puffers und dem pH	78
3.4.3.7.2.5.	Einfluß verschiedener Zusätze auf die Aktivität	81
3.4.3.7.2.6.	Spektroskopische Untersuchungen zur Art der prosthetischen Gruppe	82
3.4.4.	Untersuchungen zur Regulation des Laktatabbaus	85
3.4.4.1.	Spezifische Aktivität der Laktatoxidase in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und der Begasung....	85
3.4.4.2.	O_2-Aufnahme in vivo: Abhängigkeit vom Alter der Kultur und der Gasphase	87

Seite:

3.4.4.2.1. Abhängigkeit des O_2-Verbrauchs von der Zellmenge 87

3.4.4.2.2. O_2-Aufnahme aerob und anaerob gezogener Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen.. 89

3.5. Vergleichende Untersuchungen zur Laktatoxidation bei Gruppe I und II 9o

3.5.1. Nachweis von Laktatoxidasen bzw. NAD-unabhängigen Laktatdehydrogenasen 9o

3.5.2. Einfluß von Katalase auf den Laktatumsatz bei den Gruppen I und II 93

3.5.3. Sättigung der Laktatoxidation mit Sauerstoff 95

3.6. Untersuchung der Laktatoxidation bei L. coryniformis 98

3.6.1. Löslichkeit der NAD-unabhängigen D-LDH ... 98

3.6.2. Sauerstoffaufnahme durch den zellfreien Extrakt: Abhängigkeit vom Membrananteil... 98

3.6.3. Elektrophoretisches Verhalten der Laktatdehydrogenasen von L.coryniformis 99

3.6.4. Produkt der Laktatoxidation mit DCIP als Elektronenakzeptor ..... loo

3.6.5. Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH durch Hitze ..... loo

3.6.6. Gasaustausch und Pyruvatbildung mit und ohne Methylenblau nach Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH lo1

3.6.7. Spezifische Aktivität der NAD-unabhängigen D-LDH von L.coryniformis in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Begasung lo2

3.7. Einfluß von Sauerstoff auf das Wachstum bei Laktobazillen lo4

3.7.1. Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit.. lo4

3.7.2. Einfluß auf den molaren ökonomischen Koeffizienten ($Y_{Substrat}$) lo4

Seite:

3.7.3.	Wachstum auf Laktat	1o5
3.7.4.	Laktat- und Azetatbildung durch L.curvatus bei anaerobem bzw. aerobem Wachstum auf MRS ohne Azetat und Citrat	1o7
4.	Diskussion	111
5.	Zusammenfassung	124
6.	Literatur	128

Verwendete Abkürzungen:

DCIP	= 2,6-Dichlorphenolindophenol
ϵ	= molarer Extinktionskoeffizient
FBP	= Fructose-1,6-bisphosphat
L.	= Lactobacillus
LDH	= Laktatdehydrogenase
M	= molar
MB	= Methylenblau
N	= normal
NBT	= Nitroblautetrazolium
OD	= optische Dichte
PMS	= Phenazinmethosulfat
Sc.	= Streptococcus
ssp.	= Subspecies
Tris	= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	= Unit (internationale Enzymeinheit)

1. Einleitung

Homofermentative Laktobazillen reduzieren bei der Glycolyse anfallendes Pyruvat im allgemeinen zu Laktat, das als solches ausgeschieden wird.

Unter bestimmten Bedingungen, insbesondere bei Glucosebegrenzung oder bei aerobem Wachstum, kann es jedoch zu einem weiteren Abbau des Pyruvats durch phosphoroklastische Spaltung oder Decarboxylierung kommen, wodurch zusätzliches ATP gewonnen wird. Das äußert sich in einem gegenüber den allein zu Laktat führenden Bedingungen erhöhten molaren ökonomischen Koeffizienten ($Y_{Substrat}$ = Zunahme Trockengewicht in g/Mol verbrauchtem Substrat).

Christensen et al. (1958) fanden bei L. plantarum, daß Glucose teilweise zu Azetat und CO_2 abgebaut wurde und zwar in einem um so stärkeren Ausmaß, je weniger Glucose dem Organismus zur Verfügung stand. De Vries et al. zeigten (197o), daß L. casei bei Glucose-begrenzter kontinuierlicher Kultur (anaerob) Azetat, Äthanol und Formiat bildete. Der Anteil dieser Produkte gegenüber Laktat stieg mit sinkender Verdünnungsrate, bis bei genügend schwacher Verdünnung gar kein Laktat mehr entstand.

Gleichzeitig stieg der $Y_{Glucose}$-Wert. Dirar und Collins (1972, 1973) fanden Azetat-Bildung bei Glucoseverwertung durch L.plantarum, L.casei, L.delbrückii, L.lactis und L.bulgaricus. L.plantarum bildet aus Galactose aerob fast keine Milchsäure, sondern praktisch nur Azetat (und wahrscheinlich CO_2). Der $Y_{Galactose}$-Wert entsprach einem Gewinn von 4 Mol ATP/Mol Galactose. Azetatbildung unter aeroben Bedingungen wurde von Manderson und Doelle (1972) auch bei L.casei rhamnosus gefunden.

Aus der Möglichkeit, Pyruvat weiter abzubauen, ergibt sich die Frage, ob nicht auch von den Zellen zunächst ausgeschiedenes Laktat wieder aufgenommen und abgebaut werden kann, und ob ein solcher Laktatabbau mit Energiegewinn verbunden ist. Darüber ist bei Laktobazillen nur wenig bekannt. Ein Abbau von Laktat sollte aerob eher möglich sein als anaerob, da die anfallenden Elektronen dann eventuell auf O_2 übertragen werden könnten.

Laktobazillen gelten zwar allgemein als mikroaerophil oder anaerob, verhalten sich jedoch nicht völlig indifferent gegenüber O_2. So geht aus Berichten vieler Autoren hervor, daß diese Organismen verschiedene Substrate unter O_2-Reduktion angreifen können.

Beispielsweise oxidieren Zellsuspensionen von L.plantarum, L.plantarum arabinosus, L.casei und L.delbrückii mehr oder weniger gut Glucose, Pyruvat, Glyzerin, α-Glycerophosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Äthanol (Strittmatter, 1959a). Brown und Van Demark (1967) zeigten Oxidation von Glucose, Mannit, Glyzerin, Pyruvat und Sorbit durch L.plantarum und L.casei. Glucose-, Pyruvat- und Glyzerin-Oxidation durch L.plantarum wurde auch von Youston et al. (1975) gefunden.

Auch die Fähigkeit, Laktat zu oxidieren, ist bei einigen Laktobazillen gefunden worden (Strittmatter, 1959 a,b; Brown, Van Demark, 1967). Von L.brevis weiß man, daß er

Laktat aerob zu Azetat und CO_2 abbauen kann (Douglas, 1947). Auch die zu den Laktobazillen nahe verwandten Streptokokken können Laktat oxidieren: Sc. faecium baut L-Laktat nach folgender Gleichung ab :

$$\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Azetat} + CO_2 + H_2O$$

Er kann dabei Energie zum Wachsen gewinnen (London, 1968).

Erwähnt sei hier auch, daß L. bifermentans - allerdings unter anaeroben Bedingungen - Laktat zu Azetat, Äthanol, CO_2 und H_2 vergären kann. Er besitzt also im Gegensatz zu allen anderen Laktobazillen eine Hydrogenase, weshalb seine Zugehörigkeit zu dieser Gattung angezweifelt wird (Kandler, 1967).

Die enzymatischen Vorgänge bei den oben beschriebenen Oxidationen sind noch sehr unklar. Die Mitwirkung von Cytochromen konnte ausgeschlossen werden (Strittmatter 1959 a, b; Brown, Van Demark, 1967). Dagegen spielen Flavoenzyme eine wichtige Rolle. In einigen Fällen scheint die Elektronenübertragung auf O_2 über flavinhaltige NADH-Oxidasen zu erfolgen (Strittmatter, 1959 b; Brown, Van Demark, 1967). Bei manchen Substraten ist aber auch ein direkter oxidativer Angriff durch O_2 über Flavoenzyme möglich, z.B. bei α-Glyzerophosphat (Strittmatter, 1959 b) oder Pyruvat (Hager et al., 1954) und eventuell auch bei Laktat (Strittmatter, 1959 b).

Man kennt bei Laktobazillen drei verschiedene laktatangreifende Enzymarten:

a) Die NAD-abhängigen D- und L-spezifischen Laktatdehydrogenasen (E.C.1.1.1.28 und E.C.1.1.1.27), die allerdings eine sehr viel höhere Affinität zu Pyruvat haben als zu Laktat und daher in vivo wohl hauptsächlich die Reduktion von Pyruvat zu Laktat und nur in geringem Ausmaß die Dehydrierung von Laktat katalysieren.

b) NAD-unabhängige, flavinhaltige D- oder L-Laktatdehydrogenasen, die Redoxfarbstoffe wie 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) oder Methylenblau als Elektronenakzeptor benutzen können und Laktat zu Pyruvat oxidieren z.B. Kaufmann, Dikstein, 1961; Mizushima, Kitahara, 1962; Snoswell, 1963). Den natürlichen Elektronenakzeptor kennt man bisher nicht.

c) Bei L. delbrückii wurde eine FAD-haltige Laktatoxidase gefunden, die O_2 als Elektronenakzeptor benutzen kann, aber auch Pyruvat mit Leucoriboflavin zu Laktat reduziert (Hager et al., 1954).

Untersuchungen über Reaktionsverlauf und Funktion der beiden letztgenannten Enzymtypen gibt es nicht, doch ist eine Mitwirkung an der Laktatoxidation in vivo denkbar.

Bei vielen anderen Mikroorganismen ist die Oxidation von Laktat sehr genau untersucht worden. Sie erfolgt oftmals über membrangebundene Flavoenzyme, die mit Chinonen und Cytochromen gekoppelt sind. Der Elektronenfluß über derartige Enzymsysteme ermöglicht oxidative Phosphorylierung. Die Elektronenübertragung auf O_2 erfolgt über eine Cytochromoxidase. Ein Beispiel hierfür ist Aerobacter aerogenes (Pascal, Pichinoty, 1963).

Biochemisch am besten untersucht ist die L-Laktat-oxidase der Mycobakterien (E.C.1.1.3.2.), ein bifunktionelles Enzym, das Laktat oxidiert und zu Azetat und CO_2 decarboxyliert. Seine Funktion ist allerdings bisher unbekannt.

Zweck dieser Arbeit war es einmal, die Verbreitung des Laktatabbaus bei Laktobazillen, insbesondere bei Streptobakterien, zu untersuchen. Die entstehenden Produkte sollten geklärt und Einblick in die enzymatischen Vorgänge bei der Laktatoxidation gewonnen werden. Schließlich erhofften wir uns Hinweise auf die physiologische Rolle, die der Abbau des Laktats für die Organismen spielt.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Tab.1: Untersuchte Stämme und ihre Herkunft.

Untergattung	Species	Herkunft	Bezeichnung
Streptobacterium	L.curvatus	DSM	20010
	L.curvatus	DSM	20002
	L.sake	DSM	20017
	L.plantarum ssp.plantarum	DSM	20174
	L.plantarum ssp.rudensis	DSM	20191
	L.plantarum ssp.arabinosus	DSM	20205
	L.plantarum ssp.delbrückii	DSM	21028
	L.casei ssp.casei	DSM	20011
	L.casei ssp.alactosus	DSM	20020
	L.casei ssp.pseudoplantarum	DSM	20008
	L.casei ssp.pseudoplantarum	Elnaga	41 g
	L.casei ssp.rhamnosus	DSM	20021
	L.casei ssp.tolerans	DSM	20012
	L.casei ssp.fusiformis	DSM	20006
	L.coryniformis ssp.coryniformis	DSM	20001
	L.xylosus	DSM	20175

Fortsetzung Tab.1

Untergattung	Species	Herkunft	Bezeichnung
Thermobacterium	L.acidophilus	DSM	20243
	L.acidophilus	DSM	20079
	L.acidophilus	DSM	20356
	L.acidophilus	ATCC	314
	L.acidophilus	DSM	20077
	L.bulgaricus	Whst	3
	L.lactis	DSM	20072

Abkürzungen:

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen

Elnaga = Dr.Ibrahim G.Abo-Elnaga und Prof.Dr.O.Kandler (1965)

Whst = Bakteriologisches Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan

2.2. Nährmedien

In der Regel wurde MRS-Medium (de Man et al., 1960), entweder als Bouillon oder durch Zusatz von 15 g Agar pro l verfestigt, verwendet. Dem MRS-Medium ohne Azetat und Diammoniumcitrat wurden 11 g KH_2PO_4 und 2 g K_2HPO_4 zur Pufferung zugesetzt.

Für aerobe Massenkulturen mit Filterkerze wurde etwas Silicon-Antischaum zugesetzt.

Die Medien wurden 2o min lang bei 12o°C autoklaviert.

2.3. Anzucht

Die Stämme wurden als Stichkulturen bei 4°C aufbewahrt und alle 4 Wochen überimpft. Vor jeder Anzucht wurde mehrmals aerob bzw. anaerob vorkultiviert.

Anzuchtbedingungen:

Streptobakterien wurden bei 3o°C, Thermobakterien bei 37°C kultiviert. Zur Herstellung aerober Wachstumsbedingungen wurde das Medium in flacher Schicht durch leichtes Schütteln belüftet. Massenkulturen (2o l) wurden dagegen über eine Filterkerze mit wattegefilterter Preßluft versorgt. Anaerobe Anzucht erfolgte entweder in hoher Schicht, oder die Kulturen wurden in Anaerobenkammern mit N_2 begast. Dazu wurde die Kammer zunächst evakuiert und dann mit N_2 gefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

2.4. Messung des Wachstums

Maß für das Wachstum war die Differenz zwischen optischer Dichte (OD) des Mediums bei 578 nm (Eppendorf-Photometer) vor und nach Abzentrifugieren der Bakterien. War die OD_{578} vor dem Zentrifugieren größer als o,5, so wurde verdünnt.

2.5. Zellernte

Massenkulturen wurden unter Eiskühlung in einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia Separator), kleinere Mengen in einer

Servall-Kühlzentrifuge (Modell RC2-B, Rotor GSA, 13ooo rpm, 1o min) geerntet. Zur Ernte unter sterilen Bedingungen wurden dicht verschließbare Polycarbonatbecher verwendet.

Die Zellen wurden 2 mal mit eiskalter NaCl-Lösung gewaschen (9 g/l). Für physiologische Versuche wurden die Zellen in Puffer aufgenommen. Zur Aufbewahrung bis zum Aufschließen wurde das Zellsediment bei -18°C gelagert.

2.6. Bestimmung des molaren ökonomischen Koeffizienten

Das Wachstum erfolgte in 8o ml-Ansätzen, und zwar aerob unter Schütteln und anaerob unter einer N_2-Atmosphäre. Es wurden zwischen 0 und o,6 % Glucose zugesetzt. Nach Ende des Wachstums wurden die Zellen quantitativ geerntet, wie unter 2.5. gewaschen und anschließend in Wägegläschen getrocknet (24 h lang bei 12o°C). Nach Abkühlen im Exsikkator wurde das Zelltrockengewicht auf einer Analysenwaage bestimmt.

2.7. Zellaufschluß und Herstellung von Rohextrakten

Die Zellen wurden in der Regel mit o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 zu einer dickflüssigen Suspension verrührt und nach Zusatz einer geringen Menge DNase (Serva, Heidelberg) in der French-Press (Aminco) bei 13oo atm aufgeschlossen. Der Aufschlußvorgang wurde zweimal wiederholt und die Druckzelle zwischendurch jedesmal mit Eiswasser gekühlt.

Der Extrakt wurde in der Regel 4o min lang in einer Sorvall-Kühlzentrifuge (Modell RC2-B, Rotor SS 34, 2oooo rpm) zentrifugiert und war danach frei von Membranpartikeln. Sollten nur unversehrte Zellen abgetrennt werden, Membranpartikel jedoch im Überstand bleiben, so wurde

im gleichen Rotor 2o min lang bei 1ooo rpm zentrifugiert. Dialysiert wurde, wenn nicht anders angegeben, gegen o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5.

2.8. Manometrische Messungen

O_2-Aufnahme und CO_2-Bildung wurden manometrisch nach Umbreit et al. (1964) bestimmt. Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Bedingungen gewählt:

Es wurden entweder einarmige Gefäße von ca. 16 ml Volumen verwendet oder zweiarmige von ca. 65 ml Volumen, jeweils mit Mitteleinsatz. Das Flüssigkeitsvolumen betrug bei Verwendung der kleinen Gefäße 2-2,5 ml, bei den großen Gefäßen 5-6 ml. Die Temperatur betrug 3o°C; Wärmeangleich ca. 15 min. Die Gasphase war Luft. Die Gefäße wurden mit einer Frequenz von 76 Ausschlägen/min geschüttelt. Die Zellen oder zellfreien Präparationen waren in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 aufgenommen. CO_2-Absorption erfolgte in o,3 ml 2 N KOH, die in Filterpapier aufgesogen war.

Die CO_2-Retention wurde entweder nach Zukippen von o,3 ml 3 N H_2SO_4 aus dem 2. Arm bestimmt (insbesondere bei Versuchen mit radioaktiven Substraten) oder rechnerisch durch Verwendung des für pH 6,5 geltenden scheinbaren Löslichkeitskoeffizienten α' für CO_2 (Umbreit et al., 1964). Welche Methode im Einzelfall angewendet wurde, ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Die Zellen entstammten in der Regel der stationären Phase. Zusätzliche Angaben und Abweichungen von den hier geschilderten Bedingungen finden sich bei den einzelnen Versuchen. Bei Versuchsende wurde der Gefäßinhalt gekühlt, gegebenenfalls zentrifugiert und neutralisiert und bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Versuche mit radioaktiven Substraten: vergl. Punkt 2.1o.

Messungen unter verschiedenen Gasphasen: Für anaerobe Versuche wurden die Gefäße 1o min lang mit N_2 gespült.

Zur Herstellung unterschiedlicher O_2-Partialdrücke in den Gefäßen wurde nach Umbreit et al. (1964) Seite 68 verfahren: Es wurden zunächst O_2/N_2-Gemische von gewünschtem O_2-Gehalt hergestellt und die Gefäße anschließend damit gespült.

2.9. Reinigung der Radiochemikalien

L-[U-^{14}C]-Laktat (NEN-Chemie) enthielt ca. 1o % einer im Sauren flüchtigen Verunreinigung. Nach Wasserdampfdestillation im Sauren erwiesen sich L-[U-^{14}C]-. L-[1-^{14}C]- und L-[3-^{14}C]-Laktat (NEN-Chemie) nach der unter 2.1o.3.2. beschriebenen chromatographischen Methode als sauber.

2.1o. Auftrennung der aus markiertem Laktat gebildeten Produkte

2.1o.1. $^{14}CO_2$

Dieses wurde als $K_2{}^{14}CO_3$ aufgefangen (vergl.2.8.). Das KOH-getränkte Filterpapier aus den Einsätzen der Warburggefäße wurde in 2 ml-Meßkolben überführt, die Einsätze mehrfach mit 2 N KOH gewaschen, die Waschflüssigkeit zu dem Filterpapier gegeben, mit 2 N KOH ad 2 ml aufgefüllt und dicht verschlossen. Nach mehreren Stunden Schütteln wurde die Radioaktivität bestimmt.

2.1o.2. Auftrennung der löslichen Fraktion

Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Neish (1952): Die Suspensionen wurden nach Kühlung mit je 5oo µMol kaltem

L-Laktat, Azetat, Formiat, Pyruvat und Äthanol versetzt, quantitativ in Zentrifugenbecher überführt und die Bakterien bzw. das gefällte Protein unter Kühlung abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit H_2O gewaschen und nach Aufnahme in 2 ml 2 N KOH die Radioaktivität bestimmt. Die vereinigten Überstände wurden gegen Phenolphtalein titriert und einer Alkoholdestillation unterworfen. Das Destillat wurde in 8o ml verdünnter chromatgesättigter Chromschwefelsäure abgefangen und der Alkohol dadurch zu Azetat oxidiert. Dieses wurde durch Wasserdampfdestillation gewonnen (nach Wiesenberger, 1948) und neutralisiert.

Aus dem Rückstand der Alkoholdestillation wurde nach Ansäuern mit H_2SO_4 Azetat und Formiat durch Wasserdampfdestillation gewonnen. Diese Fraktion wurde neutralisiert und säulenchromatographisch aufgetrennt. Der Rückstand der Wasserdampfdestillation wurde mit H_2SO_4 auf pH 1 gebracht, 36 h lang kontinuierlich mit Äther extrahiert und titriert. Der Rückstand der Ätherextraktion enthielt praktisch keine Radioaktivität mehr.

Parallel zu diesem Aufarbeitungsgang wurde der Inhalt eines Warburggefäßes ohne Zusatz von Trägersubstanzen nach Abzentrifugieren der Festpartikel mit Äther extrahiert. Der Extrakt wurde qualitativ durch Dünnschichtchromatographie auf radioaktive, nicht flüchtige Säuren untersucht (vergl. 2.1o.3.2.). Dies war nach der oben beschriebenen Aufarbeitung wegen der starken Alkaliempfindlichkeit von Pyruvat nicht möglich.

2.1o.3. Identifizierung der Produkte

2.1o.3.1. Säulenchromatographie (nach Varner 1957, modifiziert)

Die wasserdampfflüchtigen Säuren wurden säulenchromatographisch identifiziert.

8 g wasserfreies Kieselgel (Mallinckrodt p.a. 1oo mesh) wurden mit 4,65 ml o,oo25 %iger Methylorangelösung vermischt, in ca. 6o ml wassergesättigtem Chloroform aufgenommen und unter leichtem Druck in eine Säule gepreßt (1 cm x 2o cm). Auf diese Schicht folgte eine weitere aus 1 g wasserfreiem Kieselgel in wasserfreiem Chloroform und darauf, zur Entsalzung der neutralisierten Säuren, o,5 g Dowex H^+. Die Säuren wurden in Form ihrer Salze in maximal o,7 ml H_2O aufgenommen und in das Dowex eingerührt. Bei der Elution waren sie deutlich als rosa Banden zu erkennen. Es wurde mit folgenden Laufmitteln eluiert (Chloroform jeweils wassergesättigt):

Chloroform
Chloroform / n-Butanol = 97,5 / 2,5 (für Azetat)
Chloroform / n-Butanol = 92,5 / 7,5 (für Formiat)
Chloroform / n-Butanol = 85 / 15

Jede Fraktion (à 4oo Tropfen) wurde in 1 ml H_2O mit Phenolphtalein aufgefangen. Durch Zählen der einzelnen Fraktionen wurde die Lage der radioaktiven, durch anschließendes Titrieren die Lage der Säure-Peaks bestimmt und eine Mengenbestimmung der Säuren durchgeführt. Die ^{14}C-enthaltenden Fraktionen, die sich in unseren Versuchen mit dem Azetat-Titrationspeak deckten, wurden vereinigt und zur genauen Radioaktivitätsbestimmung am Rotationsverdampfer eingeengt.

2.1o.3.2. Dünnschichtchromatographie

Radioaktives Laktat und Pyruvat wurden durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie in zwei Laufmitteln nach Myers und Huang (1969) identifiziert.

Platten: DC-Alufolien Cellulose (Merck, Darmstadt)
Laufmittel: Diäthyläther/Ameisensäure (9o %ig)/Wasser = 7/2/1
Phenol/Wasser/Ameisensäure (9o %ig) = 75/25/1
Referenzsubstanzen: authentisches U-^{14}C-Laktat und U^{14}C-Pyruvat
Auftragsmengen: ca. loooo cpm/Probe.

Die Substanzen wurden durch Messen der Radioaktivität mit einem Methandurchflußzählrohr (Dünnschicht-Scanner Autochron) lokalisiert.

2.11. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde in einem Tri-Carb-Flüssigkeits-szintillationsspektrometer Modell 2425 der Fa. Packard bestimmt. Es wurden Polyäthylenbehälter und ein Cocktail für wasserhaltige Proben von folgender Zusammensetzung verwendet (Patterson und Greene, 1965):

Toluol	12 l
Triton-X-loo	6 l
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	48,o g
1,4-Di [2-(5-phenyloxazolyl)] benzol (POPOP)	1,2 g

Der Cocktail wurde mit der Probe, die in 1 ml H_2O enthalten war, im Verhältnis lo/1 gemischt.

Zur Zählung von $^{14}CO_2$ (als $K_2{}^{14}CO_3$) wurde wegen der leichten Flüchtigkeit dieser Substanz vor Zugabe des Cocktails 5o µMol KOH zugesetzt. KOH hatte auf die Zählausbeute von ^{14}C-Laktat und ^{14}C-Glucose keinen Einfluß. Die Zählausbeute betrug 9o,5 %.

2.12. Puffer

Die Puffer (Azetat, Phosphat, Imidazol, Tris) wurden in 1-molarer Konzentration hergestellt (nach Rauen, 1964) und anschließend verdünnt. Wenn nötig wurde nach dem Verdünnen der pH nachgestellt.

2.13. Enzymatische Bestimmungsmethoden

Zur Bestimmung der Produkte wurden die Bakteriensuspensionen zentrifugiert, und wenn nötig neutralisiert. Zellfreie Systeme von hohem Proteingehalt wurden, sofern das Protein nicht schon durch Säurefällung im Warburggefäß (vergl.2.8.) weitgehend ausgefällt war, mit Perchlorsäure enteiweißt (vergl.Holz und Bergmeyer, 197o) und als neutralisierte Lösungen eingesetzt. Kulturmedium wurde nach Zentrifugation analysiert.

2.13.1. Milchsäure

D- und L-Milchsäure wurden nach Hohorst (1962) mit D- bzw. L-Laktatdehydrogenase bestimmt.

2.13.2. Pyruvat

Pyruvat wurde mit Kaninchenmuskel-L-LDH anhand der Abnahme der NADH-Konzentration bestimmt:

Testansatz : V_{gesamt} = 1,31 ml

0,1 M Phosphatpuffer pH 7	1 ml
NADH (2 mg/ml)	o,2 ml
Probe o. Standard (1 µMol/ml)	o,1 ml
L-LDH	o,ol ml

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 366 nm gemessen, die der Pyruvatkonzentration proportional ist. Die Eigenextinktion des Enzyms wurde durch einen Leerwert (H_2O statt Probe) berücksichtigt.

2.13.3. Glucose

Die Bestimmung der Glucose erfolgte nach Bergmeyer et al. (1970) mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

2.13.4. Azetat

Azetat wurde mit Azetatkinase nach Holz und Bergmeyer (1970) als Acetylhydroxamsäure bestimmt.

Alle verwendeten Enzyme stammten von Boehringer, Mannheim.

2.14. Messung der Enzymaktivität

Alle Messungen wurden bei 25°C im thermostatisierten Eppendorf-Photometer mit Kompensationsschreiber durchgeführt. Die Enzymmenge, die 1 µMol Substrat pro min umsetzt, entspricht einem Unit (U).

2.14.1. Laktatoxidase

Die Laktatoxidation wurde anhand der Bildung von H_2O_2 und diese in Anlehnung an Bergmeyer (1970) anhand der Oxidation von 3,3-Diaminobenzidiniumtetrachlorid durch Meerrettichperoxidase (Boehringer, Mannheim) gemessen:

Testansatz: V_{gesamt} = 1,11 ml

Einsatzmenge	Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration in d.Küvette
1 ml	Phosphatpuffer pH 6,5, O_2-gesättigt	o,1 M	o,o9 M
o,o5 ml	Li-Laktat (L o. D)	o,3 M	13,5 mM
o,o5 ml	3,3-Diaminobenzidiniumtetrachlorid	o,5 mM	22,5 µM*
o,o1 ml	Meerrettichperoxidase	2 mg/ml	18 µg/ml

* Bei höheren Konzentrationen war der Umsatz nicht linear.

Gestartet wurde mit 1-5o µl Enzymlösung. Die Oxidation von 3,3-Diaminobenzidiniumtetrachlorid wurde bei 546 nm bei 4-facher Spreizung der Schreiberskala gemessen.

$$U/ml = 2 \cdot \Delta E/min \cdot \frac{V}{\varepsilon_{546} \cdot d \cdot v}$$; V = Gesamtvolumen;

ε_{546} = 5,7 $cm^2/\mu Mol$; d = 1 cm (Lichtweg); v = eingesetztes Volumen der unverdünnten Enzymlösung (ml); Faktor 2 : da für die Oxidation eines Mols Diaminobenzidiniumtetrachlorid 2 Mol Laktat verbraucht werden.

Wurden die hier beschriebenen Standardbedingungen verändert, um die Aktivität der Laktatoxidase unter abweichenden Bedingungen zu messen (z.B. bei verschiedenen pH-Werten), so wurde jeder Test mit der einfachen und doppelten Peroxidasemenge durchgeführt, um sicher zu sein, daß es unter den vorliegenden Bedingungen nicht zu einer Reaktionsbegrenzung durch die Peroxidase kam.

2.14.2. NAD-unabhängige Laktatdehydrogenase

Es wurde die Reduktion vom 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) gemessen.

Testansatz: V_{gesamt} = 1,1 ml

Einsatzmenge	Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration i.der Küvette
1 ml	Phosphatpuffer	o,1 M	o,o91 M
o,o5 ml	DCIP	1,2 mM	54,5 µM
o,o5 ml	Li-Laktat (D o.L)	o,3 M	13,7 mM

Gestartet wurde mit 1-2o µl Enzymlösung und die Extinktionsänderung bei 578 nm verfolgt. 1 U/ml = $\Delta E/min \frac{V}{\varepsilon_{578} \cdot d \cdot v}$; ε_{578} = 16,9 $cm^2/\mu Mol$; sonstige Symbole vergl. 2.14.1.

2.14.3. NAD-abhängige Laktatdehydrogenasen

a) bei L. curvatus

Es wurde in physiologischer Richtung, also von Pyruvat nach Laktat getestet. Da D-LDH-Aktivität nur in Spuren vorhanden war, ist die hier gemessene Aktivität hauptsächlich durch die FBP- und Mn-abhängige L-LDH bestimmt. Es wurde nach Hensel et al. (1977a) bei pH 7 getestet.

b) bei L. coryniformis

Die Aktivität der D-LDH wurde anhand der NADH-Bildung (unphysiologische Richtung) gemessen (L-LDH-Aktivität war nicht vorhanden).

Testansatz: V_{gesamt} = 1 ml.

Einsatzmenge	Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration in der Küvette
o,8 ml	Trispuffer pH 7,5	o,1 M	o,o8 M
o,1 ml	D-Li-Laktat	1 M	o,1 M
o,1 ml	NAD	3o mg/ml	4,53 mM

Start mit 1-2o µl Enzymlösung; Messung bei 366 nm.
1 U/ml = $\Delta E/min \frac{V}{\varepsilon_{366} \cdot d \cdot v}$; ε_{366} = 3,3 $cm^2/\mu Mol$; sonstige Symbole vergl.2.14.1.

2.15. Proteintest

Der Proteingehalt von Enzymlösungen wurde nach der von Heil und Zillig beschriebenen Mikro-Methode bestimmt (1969). Es wurden Cellulose-Azetat-Elektrophoresefolien der Fa. Schleicher und Schüll (Kassel) verwendet.

2.16. Ammonsulfatfällung

Die Ammonsulfatfällung wurde nach Angaben von Greene und Hughes (1955) durchgeführt. Fein pulverisiertes Ammonsulfat wurde langsam unter Eiskühlung zugesetzt. Der pH wurde dabei mit 5 %iger Ammoniaklösung konstant gehalten. Die Präzipitate wurden 3o min lang in einer Sorvall-Kühlzentrifuge (Modell RC2-B; Rotor SS 34; 2oooorpm) zentrifugiert und das ausgefällte Protein, wenn nicht anders angegeben, in o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 aufgenommen.

2.17. Affinitätschromatographie

Die Oxamatsepharose wurde freundlicherweise von Herrn Dr. U. Mayr zur Verfügung gestellt (Herstellung vergl. Mayr 1977 nach Angaben von Cuatrecasas (1977), O'Carra und Barry (1972) sowie Spielmann et al. (1973)).

Der Lauf erfolgte bei 23°C mit entsprechend temperierten Lösungen. Säule: 2,2 cm × 9 cm = 34 ml Bettvolumen; es wurde mit o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 äquilibriert. Die Laufgeschwindigkeit betrug ca. 7 Tropfen/min, die Fraktionsgröße 9o Tropfen. Weitere Angaben: vergl.Versuch 3.4.3.7.1.3.2.

Zum Nachweis der Laktatoxidase im Eluat wurde - wegen der (wahrscheinlich kompetetiven) Hemmung der Laktatoxidase durch das im Eluationspuffer enthaltene Pyruvat - die 1o-fache Menge L-Laktat in den Aktivitätstest eingesetzt.

2.18. Aufnahme von Absorptionsspektren

Die Messungen erfolgten in einem Beckman-Spektrophotometer (Modell 24) bei Raumtemperatur. Es wurden Glas-Halbmikroküvetten von 1 cm Lichtweg verwendet. Alle gemessenen Fraktionen waren gegen o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 dialysiert.

Rohextrakt: 7 mg Protein/ml entsprechend o,2 U Laktatoxidase/ml; angereicherte Fraktion : 9,3 mg Protein/ml entsprechend 4,4 U Laktatoxidase/ml; Gesamtvolumen jeweils 1 ml.

Zur Reduktion der angereicherten Laktatoxidase wurde die Enzymlösung (1 ml) zunächst in der Küvette 1o min lang mit N_2 gespült, dann 2o µl einer ebenfalls mit N_2 gespülten

1 M L-Laktatlösung (= 2o µMol) zugesetzt, die Küvette sofort luftdicht verschlossen und anschließend das Spektrum vermessen.

Als Referenz diente jeweils o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5. Eine L-Laktatlösung von 2o µMol/ml in diesem Puffer zeigte in dem untersuchten Wellenlängenbereich keine Absorption.

2.19. Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese (Maurer, 1968) wurde modifiziert nach Stetter (1973) durchgeführt.
Die Reagenzien und Gele wurden nach Stetter (1973) hergestellt. Der Lauf erfolgte ebenfalls nach Stetter (1973). Pro Gel wurden maximal 5o µg Protein aufgetragen.

2.19.1. Aktivitätsnachweis der Enzyme im Gel

Die Gele wurden nach Entfernen aus den Glasröhrchen in den entsprechenden Reaktionslösungen inkubiert (25°C).

2.19.1.1. L-Laktatoxidase

o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 (O_2-gesättigt)	1o ml
3,3-Diaminobenzidiniumtetrachlorid (5 µMol/ml)	o,1 ml
L-Li-Laktat (1oo µMol/ml)	o,5 ml
Meerrettichperoxidase (2 mg/ml; Boehringer, Mannheim)	o,1 ml

Nach ca. 1o min erscheinen wegen der Oxidation von Diaminobenzidiniumtetrachlorid durch das der Laktatoxidasereaktion entstammende H_2O_2 braune Banden.

2.19.1.2. Laktatdehydrogenasen

2.19.1.2.1. mit Nitroblautetrazolium und Phenazinmethosulfat als Farbreagenz

Die Entwicklung erfolgte in physiologischer (Pyruvat ⟶ Laktat) und unphysiologischer Richtung (Laktat ⟶ Pyruvat), wie von Stetter (1973) beschrieben, jedoch unter Weglassen von FBP und Mn aus der Entwicklerlösung.

Bei Entwicklung in physiologischer Richtung erschienen nur NAD-abhängige Laktatdehydrogenasen, in unphysiologischer Richtung jedoch zusätzlich auch NAD-unabhängige Laktatdehydrogenasen. Diese können jedoch durch Weglassen des NAD aus der Entwicklerlösung von den NAD-abhängigen Enzymen unterschieden werden.

2.19.1.2.2. mit 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) als Farbreagenz

Es wurden nur NAD-unabhängige LDH nachgewiesen.
Entwicklerreagenz:

o,1 M Trispuffer pH 7,5	1o ml
DCIP	2 mg
D- oder L-Li-Laktat	5o mg

Nach ca. 1o min erschienen helle Banden auf blauem Grund.

3. Ergebnisse

3.1. Verbreitung der Fähigkeit zur Laktatoxidation unter Laktobazillen

Wie schon 1959 von Strittmatter gefunden worden war, greifen manche Laktobazillen (L. plantarum, L. arabinosus, L. delbrückii, L. casei) Laktat unter Sauerstoffverbrauch an, wobei diese Aktivität durch Zusatz des autoxidablen Redoxfarbstoffes Methylenblau stark erhöht wird.

Davon ausgehend sollte zunächst untersucht werden, wie weit die Fähigkeit, Laktat aerob anzugreifen, unter Laktobazillen, insbesondere den Streptobakterien, verbreitet ist.

Die Organismen wurden dazu aerob angezogen, in der stationären Phase geerntet und die O_2-Aufnahmerate bei Zusatz von DL-Laktat in Puffer - jeweils mit und ohne Methylenblau - gemessen. Methylenblau als autoxidabler Farbstoff sollte dabei O_2-Aufnahme ermöglichen, falls eine direkte Übertragung von Elektronen auf O_2 nicht

oder nur schlecht möglich wäre. Von allen Stämmen wurde die gleiche Zellmenge eingesetzt (OD_{578} ca. 7o).

In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß manche Organismen sehr viel endogenes Material enthielten, das schon ohne Laktatzusatz eine beträchtliche O_2-Aufnahme ermöglichte, so daß Zusatz von Laktat keine Steigerung der O_2-Aufnahmerate mehr bewirkte. Solche Stämme wurden zunächst durch aerobes Bebrüten in sterilem Puffer (12 h lang) verarmt und nach Waschen in den Versuch eingesetzt. Bei allen übrigen Organismen war die "Leeratmung" auch ohne vorherige Verarmung sehr gering oder hatte sich bis zum Zeitpunkt der Substratzugabe sehr stark verlangsamt.

Tabelle 2 zeigt die O_2-Aufnahmegeschwindigkeiten verschiedener Arten nach Laktatzusatz (während der anfänglichen linearen Phase) im Vergleich zu den gleichzeitig in Kontrollansätzen ohne Laktat gemessenen Raten und zwar jeweils mit und ohne Methylenblau. Wie ersichtlich ist die steigernde Wirkung von Laktat auf die O_2-Aufnahmerate je nach Stamm sehr unterschiedlich und hängt bei manchen Organismen vom Methylenblauzusatz ab. Die untersuchten Stämme lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

Gruppe I zeichnet sich durch eine relativ starke O_2-Aufnahme aus und Methylenblau wirkt nur schwach fördernd, bei einzelnen Stämmen sogar eher hemmend. Diese Gruppe ist sozusagen "methylenblauunabhängig".

Bei Gruppe II dagegen sind die O_2-Aufnahmeraten ohne Methylenblau sehr gering oder unterscheiden sich gar nicht von der "Leeratmung". In Gegenwart von Methylenblau kommt es dagegen zu starker Sauerstoffaufnahme. Diese Gruppe ist also "methylenblauabhängig".

Tab.2: O_2-Aufnahmeraten bei Laktatverwertung durch Laktobazillen.
Zellen in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; OD_{578} ca. 7o; Methylenblau 1 mg/ml; Substrat 2o µMol DL-Laktat; Endvolumen 2,3 ml.
* vorherige Verarmung der Zellen.

Spezies	Bezeichnung	O_2-Aufnahmerate (µMol/h)				Methylenblau-Bleichung	Gruppe
		mit Methylenblau		ohne Methylenblau			
		ohne Laktat	mit Laktat	ohne Laktat	mit Laktat		
L.curvatus	DSM 2oolo	o,4	11,4	o,4	9,6	+	I
L.curvatus	DSM 2ooo2	o,2	9,3	o,2	9,6	+	I
L.sake	DSM 2ool7	1,4	12,o	1,o	14,4	+	I
L.plantarum ssp.plantarum*	DSM 2o174	1,o	4,o	o,4	1,2	-	II
L.plantarum ssp.rudensis*	DSM 2o191	o,8	8,o	o,4	2,8	-	II
L.plantarum ssp.arabinosus*	DSM 2o2o5	o,7	4,o	o,4	1,2	-	II
L.plantarum ssp.delbrückii*	DSM 21o28	o,6	5,o	o,4	1,6	-	II
L.casei ssp.casei*	DSM 2ooll	o,1	4,5	o,1	o,2	-	II
L.casei ssp.alactosus*	DSM 2oo2o	o,7	3,3	o,5	1,35	-	II
L.casei ssp.pseudoplantarum*	DSM 2ooo8	o,5	4,2	o,5	1,8	-	II
L.casei ssp.pseudoplantarum*	Elnaga 41g	o,1	3,2	o,o	o,25	-	II
L.casei ssp.rhamnosus*	DSM 2oo21	o,15	4,2	o,3	o,6	-	II
L.casei ssp.tolerans*	DSM 2ool2	o,o	2,7	o,o	o,35	-	II
L.casei ssp.fusiformis*	DSM 2ooo6	o,4	7,o	o,4	o,4	-	II
L.coryniformis*	DSM 2oool	o,25	4,6	o,2	1,o	+	II
L.xylosus	DSM 2o175	o,3	8,o	o,6	o,6	+	II
L.acidophilus	DSM 2o243	o,13	6,2	o,12	4,o	-	I
L.acidophilus	DSM 2oo79	o,o3	1,o	o,12	o,8	-	I
L.acidophilus	DSM 2o356	o,6	3,o	o,35	1,7	-	I
L.acidophilus	ATCC 314	1,1	3,3	o,5	2,7	-	I
L.acidophilus	DSM 2oo77	o,24	6,o	o,12	4,o	-	I
L.bulgaricus	Whst 3	o,4	2,8	o,4	3,1	-	I
L.lactis	DSM 2oo72	o,7	12,o	o,7	18,o	+	I

Bei den hier untersuchten Arten verhalten sich die Stämme hinsichtlich ihrer Gruppenzugehörigkeit einheitlich.

Tabelle 2 gibt auch an, ob während der O_2-Aufnahme eine Entfärbung des Methylenblau zu beobachten war, was eine hohe intermediäre Konzentration von reduziertem (gebleichtem) Methylenblau bedeutet. Die Stämme der einzelnen Gruppen verhalten sich in dieser Hinsicht nicht einheitlich. Bei Gruppe I kam es bei allen sehr rasch O_2-aufnehmenden Stämmen zu Methylenblau-Bleichung, bei den relativ schwach "atmenden" Stämmen von L. acidophilus und L. bulgaricus trat dagegen keine Entfärbung auf. Die zu Gruppe II gehörigen L. plantarum - und L. casei - Stämme bleichten Methylenblau nicht, bei L. coryniformis und L. xylosus, die ebenfalls unter Gruppe II fallen, kam es dagegen zur Entfärbung. Eine Korrelation mit der "Atmungsgeschwindigkeit", ähnlich der bei Gruppe I feststellbaren, liegt hier nicht vor, wie ein Vergleich des relativ langsam "atmenden", aber methylenblauentfärbenden L. coryniformis auf der einen Seite mit L. casei fusiformis und L. plantarum rudensis auf der anderen Seite zeigt.

Die Gruppen I und II unterscheiden sich wohl in ihrer Fähigkeit, Elektronen von Laktat auf O_2 zu übertragen. Die Stämme der Gruppe I besitzen offenbar recht aktive Oxidasen, welche die vom Laktat stammenden Elektronen direkt auf O_2 übertragen können, während solche Enzyme bei Gruppe II, wenn überhaupt, so nur schwach aktiv sind. Die Stämme dieser Gruppe haben aber Enzyme, die Elektronen von Laktat auf Methylenblau übertragen können, das dann vom Sauerstoff reoxidiert wird.

Bei der Interpretation der Methylenblau-Unabhängigkeit der Gruppe I muß man zwischen den sehr rasch "atmenden" methylenblauentfärbenden Stämmen (z.B. L.curvatus) und den relativ langsam "atmenden", Methylenblau nicht entfärbenden Stämmen (z.B. L.bulgaricus) unterscheiden.

Die erstgenannten Stämme können Methylenblau zwar reduzieren (über die gleichen oder andere Enzyme wie Sauerstoff). Daß der Farbstoff trotzdem keine Steigerung der O_2-Aufnahmerate bewirkt, liegt wahrscheinlich daran, daß andere mit der Laktatoxidation verbundene Vorgänge bei so hohen "Atmungsgeschwindigkeiten" begrenzt sind (z.B. Transportvorgänge). Bei den Methylenblau nicht entfärbenden Stämmen von Gruppe I können die Elektronen von Laktat auf O_2, jedoch nicht auf Methylenblau übertragen werden.

Die bei einigen Organismen beobachtete Methylenblauentfärbung läßt sich leicht dadurch erklären, daß zwar eine sehr rasche Elektronenübertragung auf den Farbstoff möglich ist, die wohl spontane Reoxidation des gebleichten Methylenblaus durch O_2 jedoch viel langsamer erfolgt, so daß es zu einem Anstau von reduziertem Methylenblau kommt. Bei einigen Vertretern der Gruppe II, die den Redoxfarbstoff zwar nicht bis zu einem sichtbaren Grad entfärben, also einen sehr niedrigen Pool an reduziertem Methylenblau haben, aber trotzdem sehr viel höhere O_2-Aufnahmegeschwindigkeiten erreichen als z.B. L.coryniformis mit seinem hohen Pool an reduziertem Methylenblau (Bleichung !), muß man wohl annehmen, daß die Reoxidation des Farbstoffs durch O_2 enzymatisch beschleunigt wird, während diese Reaktion bei den methylenblauentfärbenden Organismen wahrscheinlich nur spontan abläuft.

3.2. Einfluß von Mangan II auf Milchsäurebildung und Laktatoxidation

Einige Laktobazillen besitzen eine Mn-aktivierbare L-LDH, z.B. L. curvatus, L. casei, L. sake, L. xylosus (de Vries et al., 1970; Stetter, 1973) und es sollte nun geprüft werden, ob sich diese Eigenschaft des Enzyms auch in vivo auswirkt, d.h. ob Mn einen fördernden Einfluß auf die Milchsäurebildung hat.

Zur Verarmung an Mn wurden die Zellen auf MRS-Medium gezogen (aerob), dem kein Mn zugesetzt worden war (nach zweimaliger Vorkultur auf diesem Medium). Geerntet wurde in der stationären Phase.

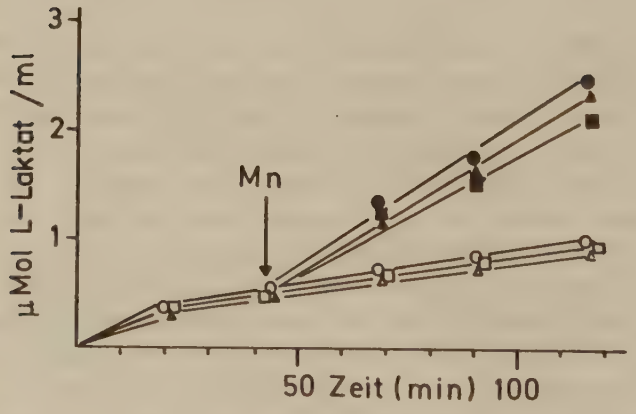

Abb.1:

Mn-Einfluß auf die Glucosevergärung durch L. curvatus 2oolo. 3o°C; o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; Zelldichte der Suspension OD_{578} = o,55; Glucose: o,25 M; Mn: $3 \cdot 10^{-4}$ M $MnCl_2$; Chloramphenicol 5o µg/ml; Actinomycin D: 2 µg/ml.
o = ohne Induktionshemmstoffe; Δ = mit Chloramphenicol;
□ = mit Actinomycin D; ausgefüllte Symbole: Mn zugesetzt.

Zunächst wurde der Einfluß von Mn auf die Glucosevergärung von L. curvatus verfolgt. Da die L-LDH von L. curvatus bei relativ neutralem pH, nicht dagegen im Sauren (um pH 4,5), durch Mn aktiviert wird (Hensel et al., 1977a), wurden die Versuche bei pH 6,5 durchgeführt (in o,1 M Phosphatpuffer). In Parallelansätzen wurde Chloramphenicol als Translations- bzw. Actinomycin D als Transcriptionshemmer zugesetzt, um eine eventuell durch Mn bewirkte Enzymneubildung zu unterbinden. (L. curvatus besitzt eine Mn-aktivierbare RNA-Polymerase; Stetter und Kandler, 1973b).

Wie Abbildung 1 zeigt, kommt es durch Mn tatsächlich zu einer Aktivierung der L-Laktatbildung, die gegen Chloramphenicol und Actinomycin D unempfindlich ist. (D-Laktat wird nicht gebildet, da bei Wachstum ohne Mn die Induktion der Razemase unterbleibt (Stetter, 1973)).

Wenn die Förderung der Laktatbildung durch Mn bei L. curvatus alleine durch eine Aktivierung der L-LDH bewirkt wird, so sollte sich ein solcher Effekt bei einem Organismus, dessen LDH von Mn unabhängig ist, nicht zeigen. Daher wurde die Wirkung von Mn auf die Laktatbildung durch Mn-verarmte Zellen von L. plantarum 2o174 untersucht, der eine D- und eine L-LDH besitzt, die beide nicht Mn-aktivierbar sind.

Auch bei diesem Organismus kam es nach Mn-Zusatz zu einer Förderung der Laktatbildung aus Glucose (Abb.2). Offenbar sind neben der LDH mancher Mikroorganismen auch andere am Kohlenhydratabbau beteiligte Enzyme Mn-abhängig, und man kann daher im Falle von L. curvatus nicht unterscheiden, ob die Aktivierung der Laktatbildung durch Wirkung des Mn auf die LDH oder auf andere Enzyme hervorgerufen wird.

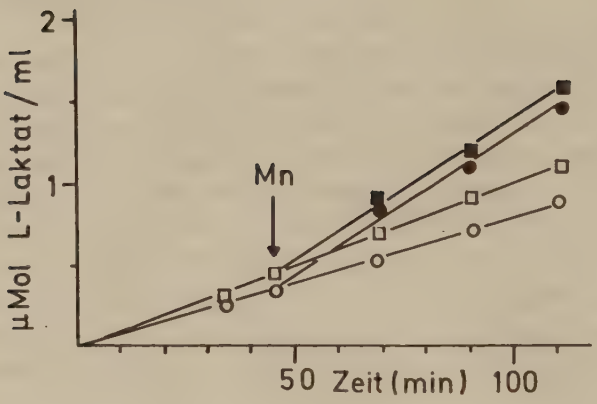

Abb.2:

Mn-Einfluß auf die Glucosevergärung durch L.plantarum 2o174. Bedingungen: vergl. Abb.1, jedoch keine Induktionshemmstoffe zugesetzt.
□ = L-Laktat; o = D-Laktat; ausgefüllte Symbole: Mn zugesetzt.

Beim oxidativen Abbau des Laktats, bei dem Überlagerungen mit Einflüssen des Mn auf andere vorgeschaltete Enzyme wegfallen, wäre ein auftretender Mn-Effekt ein Hinweis auf die Beteiligung der LDH am Abbau des Laktats. Es wurde daher der Einfluß des Mn auf die Laktatoxidation durch Mn-verarmte Zellen von L. curvatus 2oolo untersucht, und zwar, wie in den obigen Versuchen, bei pH 6,5, wo Mn einen deutlichen Effekt auf die LDH haben sollte.

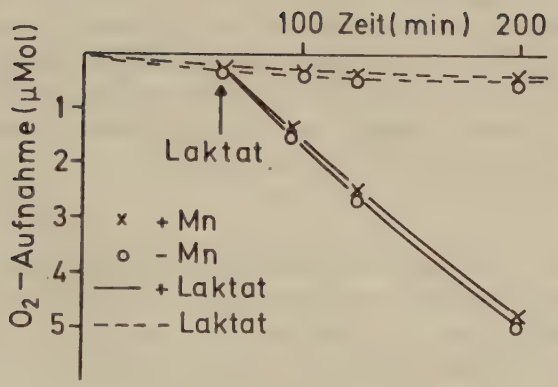

Abb.3:

Einfluß von Mn auf die Laktatoxidation von L.curvatus 2oolo. 3o°C; o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; Zelldichte der Suspension OD_{578} = 2o; 2o µMol DL-Laktat; $MnCl_2$: $3 \cdot 1o^{-4}$ M; Endvolumen 2,3 ml.

Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, hat Mn keinerlei Wirkung auf die O_2-Aufnahmerate, was den Verdacht nahelegt , daß die LDH an diesem Abbauweg nicht beteiligt ist.

3.3. Untersuchung der Azetat- und CO_2-Bildung bei der Laktatoxidation durch Laktobazillen

Wie London (1968) bei Sc. faecium gefunden hatte, baut dieser Organismus Laktat nach folgender Gleichung ab:

$$\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Azetat} + CO_2$$

Bei Mycobakterien ist die gleiche Stöchiometrie für die Laktatoxidation gefunden worden (Sutton, 1954), und zwar geschieht der Abbau hier in einem einzigen Schritt durch ein bifunktionelles Enzym. Die Gattung Lactobacillus ist zwar hinsichtlich der aerob aus Laktat gebildeten Produkte noch kaum untersucht worden, doch ist einiges über den aeroben Hexoseabbau bekannt. Wie eingangs schon erwähnt, kommt es dabei oft zur Bildung von Azetat, vermutlich aus Pyruvat.

Es war denkbar, daß auch der aerobe Laktatabbau über Pyruvat erfolgen würde, und daß dieses zu Azetat weiterverwandelt würde. Es lag also nahe, bei der Suche nach Produkten der Laktatoxidation auf Azetat und CO_2 zu testen. Es wurde daher bei einzelnen Stämmen der verschiedenen Arten die durch Laktatzusatz ausgelöste O_2-Aufnahme und CO_2-Bildung mit und ohne Methylenblau verfolgt und anschließend auf Azetat getestet. Die Versuchsdauer betrug je nach Stamm ca. 3-7 h. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn der O_2-Verbrauch zumindest bei den Ansätzen mit Methylenblau eine meßbare Azetatmenge erwarten ließ. Ansätze mit und ohne Methylenblau wurden bei den einzelnen Stämmen gleichzeitig gestartet und abgebrochen. Außer bei L. sake war bei Versuchsabbruch der Gasaustausch bei allen Stämmen noch mehr oder weniger stark im Gange.

Wie Tabelle 3 zeigt, kam es tatsächlich in den meisten Fällen zu CO_2- und Azetatbildung. Eine Ausnahme bildete nur L. xylosus, bei dem Laktat ohne Zusatz von Methylenblau keinerlei Förderung des Gasaustausches und der Azetatbildung über den endogenen Stoffwechsel hinaus bewirkte.

Tab.3: Laktatoxidation durch Laktobazillen: O_2-Verbrauch, Azetat- und CO_2-Bildung.

Substrat 62 µMol DL-Laktat; Methylenblau 1 mg/ml; Angaben in µMol; die Werte wurden mit den entsprechenden an Parallelansätzen ohne Substratzusatz gewonnenen Daten korrigiert; CO_2-Retention durch α' berücksichtigt. *) Vorherige Verarmung der Zellen

Stamm	Gruppe	mit Methylenblau					ohne Methylenblau				
		O_2-Verbrauch	CO_2-Bildung	Azetatbildg.	CO_2/O_2	CO_2/Azetat	O_2-Verbrauch	CO_2-Bildung	Azetatbildg.	CO_2/O_2	CO_2/Azetat
L.curvatus 2oolo	I	3o,5	3o,9	29,4	1,o1	1,o5	24,2	26,4	27,5	1,o9	o,96
L.sake 2oo17	I	32,2	27,4	26,4	o,85	o,96	37,7	43	45	1,1	o,96
L.lactis 2oo72	I	5o,3	5o,4	51,5	1,o1	o,98	54,4	55,4	59	1,o1	o,94
L.acidophilus 2o243	I	35,o	3o,2	32,9	o,86	o,92	31,5	29,6	34,6	o,94	o,85
L.bulgaricus Whst 3	I	4,2	3,2	3,1	o,76	1,o3	4,o	3,2	4,2	o,8	o,76
L.plantarum 2o174*	II	3o,o	13,9	23,1	o,46	o,6	2,7	o,5	4,7	o,19	o,11
L.casei 2oo11	II	32,75	18,2	1o,7	o,55	1,7	2,4	o,6	o,6	o,25	1,o
L.coryniformis 2ooo1*	II	21,6	2o,7	22,7	o,96	o,91	5,1	4,3	6,1	o,85	o,7
L.xylosus 2o175	II	33,6	35,9	3o,2	1,o7	1,2	0	0	0	-	-

Die Einteilung in die Gruppen I und II, die aufgrund der durch Laktat ausgelösten O_2-Aufnahmeraten und deren Beeinflussung durch Methylenblau vorgenommen wurde, zeigt auch hier ihre Berechtigung. Die zu Gruppe I gehörigen Stämme erwiesen sich nämlich auch hinsichtlich der CO_2- und Azetatbildung als relativ"methylenblauunabhängig", während Methylenblau bei den unter Gruppe II fallenden Stämmen nicht nur den O_2-Verbrauch sondern auch die CO_2- und Azetatbildung sehr stark förderte.

Die Tabelle gibt auch die Quotienten CO_2/O_2 sowie CO_2/Azetat an. Wie ersichtlich, betragen diese Werte bei Gruppe I ungefähr 1, was der bei Streptokokken (London, 1968) und Mycobakterien (Sutton, 1954) gefundenen Stöchiometrie entspricht. Diese Werte werden auch dort durch Methylenblau kaum verändert, wo dieser Farbstoff den gesamten Umsatz ein wenig beeinflußt (leicht hemmend bei L. sake und leicht fördernd bei L. curvatus). Im Gegensatz zu Gruppe I erscheint Gruppe II viel heterogener: zwar verhalten sich die Angehörigen dieser Gruppe insofern einheitlich, als - wie schon gesagt - sowohl der O_2-Verbrauch als auch die CO_2- und Azetatbildung durch Methylenblau stark gefördert werden, doch sind die Quotienten CO_2/O_2 und CO_2/Azetat je nach Stamm sehr unterschiedlich und werden durch Methylenblau auch unterschiedlich stark beeinflußt. Bei L. coryniformis liegen diese Werte nahe 1 und erhöhen sich in Gegenwart von Methylenblau nur wenig. Bei L. plantarum, der ohne Methylenblau im Vergleich zum O_2-Verbrauch und der Azetatbildung nur sehr wenig CO_2 bildete, wird die CO_2-Bildung durch den Farbstoff mehr gesteigert als der O_2-Verbrauch und die Azetatbildung, so daß die Werte CO_2/O_2 und CO_2/Azetat ansteigen. Ähnliches gilt für L. casei. Hier übersteigt bei Methylenblauzusatz die CO_2-Menge sogar die Azetatmenge, während ohne Methylenblau gleich viel CO_2 wie Azetat gebildet wird.

3.4. Untersuchung des Laktatabbaus bei L. curvatus

Wie die vorhergehenden Versuche zeigen, bilden die Laktobazillen bei Laktatzusatz je nach Stamm mehr oder weniger viel Azetat und CO_2 - unter gleichzeitigem O_2-Verbrauch. Daneben scheinen noch andere Produkte zu entstehen. So liegt die Vermutung nahe, daß in den Fällen, in denen das gebildete Azetat die CO_2-Menge übertraf, Ameisensäure als weiteres C_1-Produkt entstand. Außerdem könnten auch Pyruvat und Azetoin gebildet worden sein. Zur näheren Untersuchung der Laktatoxidation wurde ein Vertreter der Gruppe I herangezogen, der Laktat relativ rasch umsetzt, und kaum Reservestoffe besitzt, nämlich L. curvatus 2oolo.

3.4.1. Stereospezifität der Laktatoxidation

3.4.1.1. bei Zellen

In den bisherigen Versuchen war immer DL-Laktat als Substrat eingesetzt worden, so daß bisher unklar ist, ob beide oder nur eines der Isomeren umgesetzt wird, und wenn ja, welches. Im folgenden Versuch wurden den Zellen daher reine Laktatisomere angeboten und der jeweilige O_2-Verbrauch verfolgt.

Wie man aus Abbildung 4 ersieht, kam es bei beiden Substraten zu einer raschen O_2-Aufnahme. Während jedoch bei L-Laktatzusatz die O_2-Aufnahme von Anfang an mit konstanter Geschwindigkeit erfolgte, kam es bei D-Laktatzusatz zunächst zu einer lag-Phase, nach der sich die O_2-Aufnahmerate jedoch der bei L-Laktatumsatz gemessenen anglich. Vermutlich muß D-Laktat zunächst in L-Laktat verwandelt werden, bevor es oxidiert werden kann, und erst nach Erreichen einer bestimmten L-Laktatkonzentration verläuft diese Oxidation mit optimaler Geschwindigkeit.

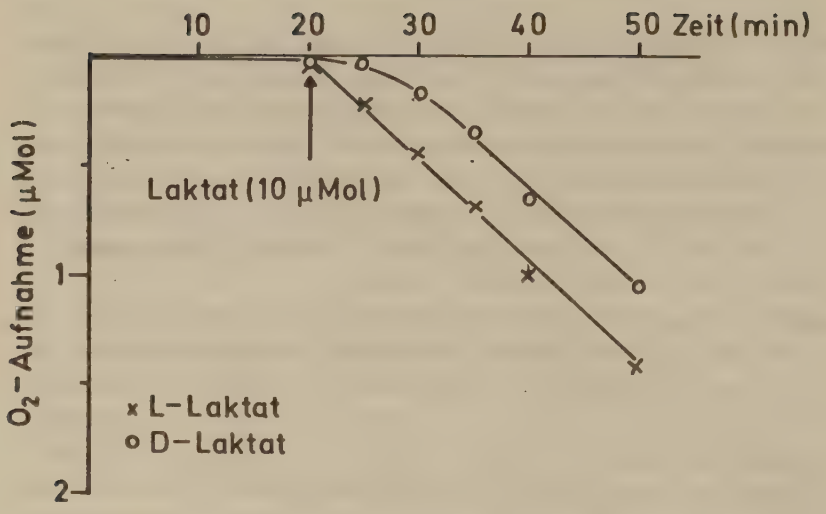

Abb.4:
Stereospezifität der Laktatoxidation durch razemase-haltige Zellen von L. curvatus 2oolo.

Von L. curvatus ist bekannt (Stetter und Kandler, 1973a), daß er in der frühstationären Phase eine durch L-Laktat induzierte hochaktive Razemase besitzt, die wohl für das beschriebene Phänomen verantwortlich ist. Dann sollten jedoch Zellen, die keine Razemase haben, nur L-Laktat umsetzen können. Die Induktion der Razemase unterbleibt, wenn L. curvatus unter Mangan-Mangel gezogen wird, also etwa auf MRS-Medium, dem kein Mn zugesetzt wurde. Der obige Versuch wurde daher mit solchen Zellen wiederholt (aerobe Anzucht auf MRS ohne Mn nach mehrmaliger Vorkultur

auf MRS ohne Mn). Diese Zellen bildeten im Gegensatz zu normal gezogenen aus Glucose nur L-Laktat, konnten also nicht razemisieren (Daten nicht gezeigt). Wie die Abbildung 5 zeigt, wird nur L-Laktat oxidiert. Die Oxidation des Laktats ist also tatsächlich L-spezifisch, und nur das Vorhandensein einer Razemase ermöglicht es den Zellen, beide Isomere anzugreifen.

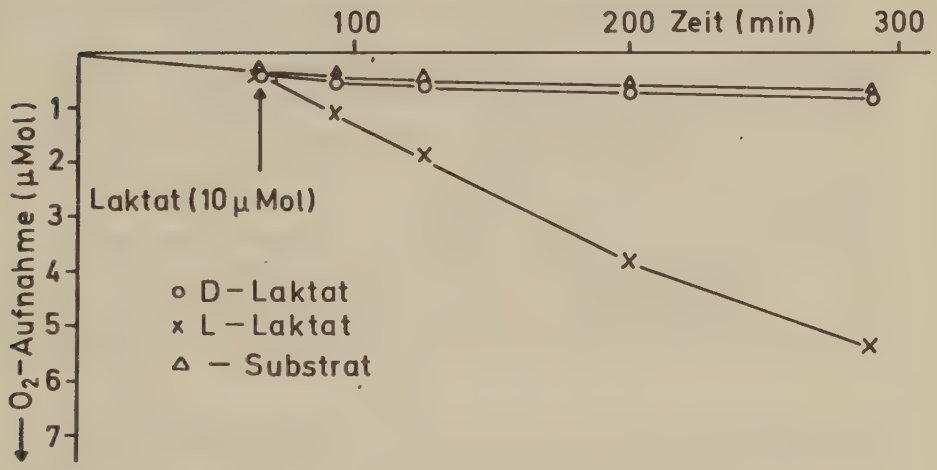

Abb.5:

Stereospezifität der Laktatoxidation durch razemasefreie Zellen von L. curvatus 2oolo.

3.4.1.2. im zellfreien Extrakt

Ein aus razemasehaltigen Zellen hergestellter zellfreier Extrakt zeigte bei L-Laktatzusatz eine rasche O_2-Aufnahme. D-Laktat wurde aber nur sehr langsam oxidiert, und die O_2-Aufnahme hörte schon auf, nachdem erst etwa 1/10 der bei L-Laktatzusatz verbrauchten O_2-Menge aufgenommen worden war (Abb.6).

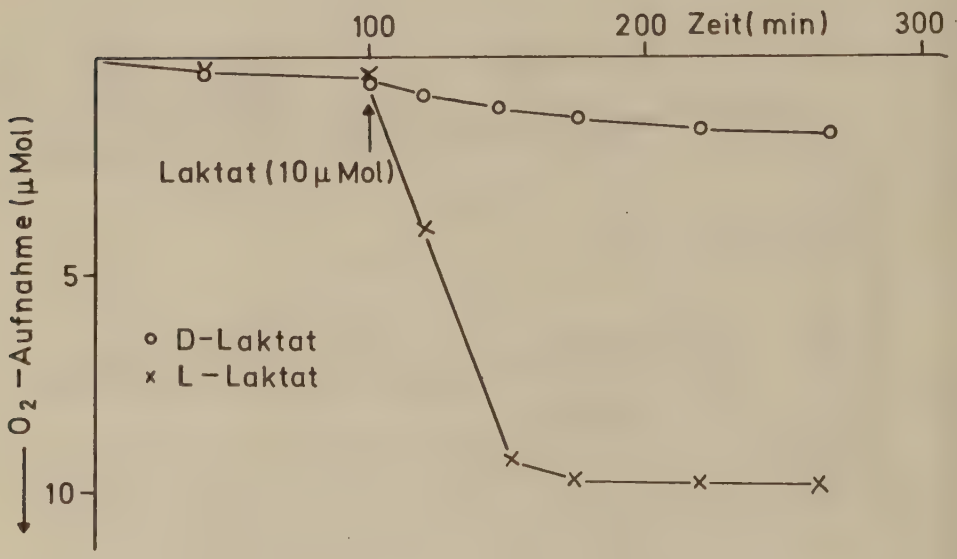

Abb.6:
Stereospezifität der Laktatoxidation durch einen zellfreien Extrakt aus razemasehaltigen Zellen von L. curvatus 2oolo.

Es ist bekannt, daß die Razemase von L. curvatus sehr O_2-empfindlich ist (Stetter, 1973). Da im obigen Versuch (wie auch in allen späteren) keine Substanzen zur Senkung des Redoxpotentials (wie Mercaptoäthanol oder Dithioerythrit) zugesetzt worden waren, läßt sich das Ergebnis leicht durch die Annahme erklären, daß die Razemase zum größten Teil schon während des Zellaufschlusses und der Rest dann beim Schütteln des Extraktes unter Luftsauerstoff inaktiviert worden war.

3.4.2. Abbau von ^{14}C-L-Laktat durch Zellsuspensionen von L.curvatus

3.4.2.1. Inkubation von L.curvatus mit Laktat unter aeroben Bedingungen

Der oxidative Abbau des Laktats sollte nun anhand von Markierungsversuchen genauer untersucht werden. Durch den Einsatz markierten Substrates sollten Verfälschungen der Produktanalyse durch den endogenen Stoffwechsel, wie sie bei den enzymatischen und manometrischen Analysen möglich sind, ausgeschaltet werden. Durch Verwendung positionsmarkierten Substrates sollte weiterhin die Herkunft des Kohlenstoffs der Produkte aus den verschiedenen Positionen des Laktats ermittelt werden.

Aerob gezüchtete Zellen aus der stationären Phase wurden zunächst durch Schütteln in o,1 m Phosphatpuffer pH 6,5, zwei Stunden lang an Reservestoffen verarmt, um eine zu starke Verdünnung des zugesetzten Substrates durch endogen gebildetes Laktat zu verhindern. Die Zellen wurden danach gewaschen und bei 3o°C in Warburggefäßen inkubiert. Die optische Dichte der Zellsuspension in den Gefäßen betrug 2,o. Neben dem O_2-Verbrauch und der CO_2-Bildung mit und

ohne L-Laktat wurden die Absolutmengen der Produkte enzymatisch bestimmt. Die enzymatischen Tests erbrachten bei Gefäßen mit bzw. ohne KOH im Mitteleinsatz das gleiche Ergebnis. Der O_2-Partialdruck hat also keinen Einfluß auf den Abbau des Laktats. Man kann daher davon ausgehen, daß der durch Vergleich der Druckänderungen in Parallelgefäßen mit bzw. ohne KOH ermittelte CO_2-Wert genau dem im Ansatz mit KOH gemessenen O_2-Wert entspricht. In Parallelansätzen wurde die Radioaktivitätsverteilung auf die Produkte ermittelt.

Bei Laktatzugabe kommt es zu rascher O_2-Aufnahme (Abb.7). Die CO_2-Bildung folgt dagegen nur mit einiger Verzögerung. Die Kontrolle ohne Laktat zeigt nur geringfügigen Gasaustausch. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis der enzymatischen und manometrischen Produktanalyse. Der größte Teil des verbrauchten Laktats wird unter O_2-Verbrauch zu Azetat und CO_2 umgesetzt. Das Verhältnis von O_2/CO_2/Azetat beträgt nahezu 1/1/1. Daneben entstehen noch geringe Mengen Pyruvat. Die Kontrolle zeigt, daß die oxidative Stoffwechselaktivität der Zellen ohne Substratzusatz nur gering war.

Die Analyse der Radioaktivitätsverteilung auf die Produkte bestätigte die oben gewonnenen Ergebnisse (Tab.5). Der Abbau von uniform markiertem Laktat zeigt deutlich, daß CO_2 und Azetat im Verhältnis 1/1 gebildet werden. Aus den Ansätzen mit positionsmarkiertem Laktat geht hervor, daß das gesamte CO_2 aus der Carboxylgruppe des Laktats stammt, während sich die Methylgruppe im Azetat wiederfindet. Das C_1 des Laktats wird also decarboxyliert, C_2 und C_3 werden zu Azetat umgesetzt.

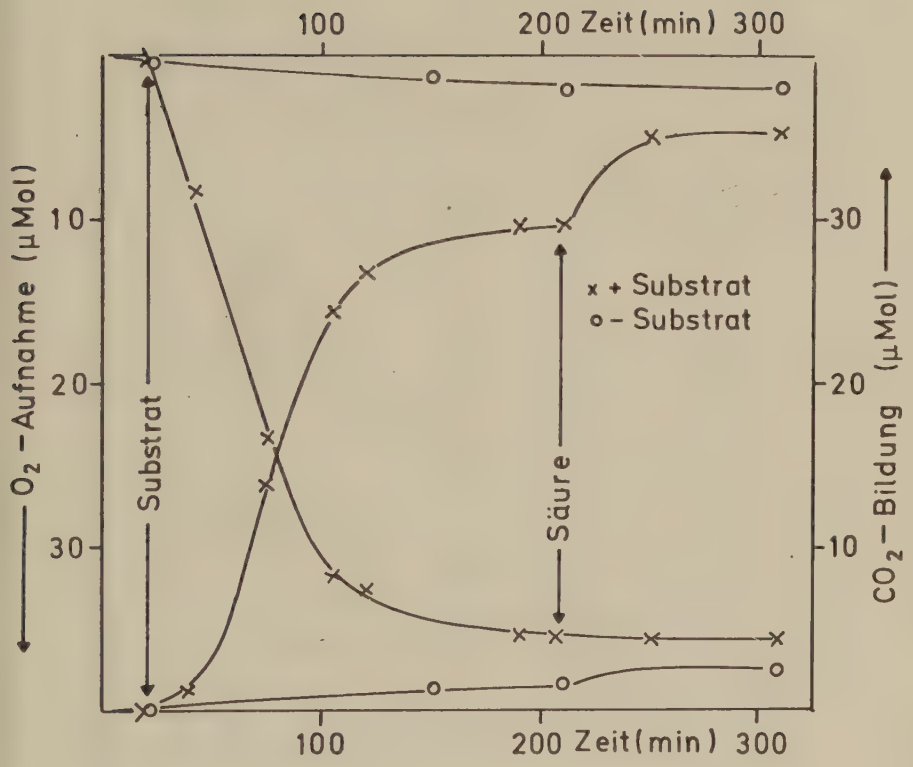

Abb.7:

L-Laktatabbau durch ruhende Zellen von L.curvatus 2oolo unter Luftsauerstoff. 36,9 µMol L-Laktat; CO_2-Retention durch Säurezusatz berücksichtigt.

Durch Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, daß in der Fraktion der wasserdampfflüchtigen Säuren an markierten Verbindungen lediglich Laktat und Pyruvat, aber keine anderen Produkte enthalten waren. Neben Azetat und CO_2 tritt also nur Pyruvat als C-haltiges Produkt des Laktatabbaus auf.

Tab.4: Enzymatisch bzw. manometrisch bestimmte Bilanz der L-Laktatoxidation durch ruhende Zellen von L. curvatus.
Alle Angaben in µMol.

Spalte	Bedingung	O_2-Verbrauch	CO_2	Azetat	Pyruvat	Laktat	
						L	D
I	endogener Stoffwechsel bis Substrat-Zusatz	o,2	o,5	o,7	o,7	o,63	o,1
II	36,9 µMol Laktat zugesetzt	35,4	35,2	31,6	1,9	o,91	o,37
II-I	Umsatz ab Substratzusatz	35,2	34,7	3o,9	1,2	o,28	o,27
III	Kontrolle ohne Substrat	2,2	2,5	2,6	1,o	o,55	o,19

Tab.5: Verteilung der Radioaktivität nach Umsatz von markiertem L-Laktat durch ruhende Zellen von L. curvatus 2oolo.

Markierung des Laktats	Einsatz	CO_2			Azetat			zu CO_2 und Azetat umges. Aktiv. = "X"	nicht wasserdampfflüchtige Säuren		Zellen		flüchtige Neutralprod.		Ausbeute
	$\times 10^3$ cpm	$\times 10^3$ cpm	%	% von "X"	$\times 10^3$ cpm	%	% von "X"	$\times 10^3$ cpm	$\times 10^3$ cpm	%	$\times 10^3$ cpm	%	$\times 10^3$ cpm	%	%
U-^{14}C	912	266	29,8	32,6	537	6o	65,7	819	91	1o,2	1	o,11	1,5	o,17	98
1-^{14}C	1141	1o7o	93,1	1o1	o,2	o,o2	o,o2	1o62	78	6,8	o,5	o,o4	1	o,o9	1oo
3-^{14}C	1o8o	1,5	o,14	o,15	978	92,6	97	1oo3	76	7,2	o,3	o,o3	1	o,1	97

3.4.2.2. Inkubation von L. curvatus unter anaeroben Bedingungen

Der Abbau des Laktats zu Azetat, CO_2 und Pyruvat ist nur unter aeroben Bedingungen möglich, wie folgender Versuch zeigt: In einem Parallelansatz zum obigen Versuch wurde L. curvatus unter einer N_2-Atmosphäre mit 36,9 µMol L-[U-^{14}C]-Laktat inkubiert. Wie man sieht (Tab.6), kam es während eines Zeitraumes von über 3 h weder zu CO_2- noch zu Azetatbildung aus Laktat. Das eingesetzte Laktat blieb vielmehr unverändert erhalten.

Tab.6: Inkubation ruhender Zellen von L.curvatus mit L-Laktat unter anaeroben Bedingungen

Bedingung	Druck-änderung *	$^{14}CO_2$-Bildung % Einsatz	Azetat (enzym. get.)	Laktat (L+D) µMol
36,9 µMol L-[U-^{14}C]-Laktat zug. (912ooo cpm)	± 0	o,1 %	0	4o,8
kein Substrat zugesetzt	± 0	-	nicht get.	3,3

*) Gefäß mit KOH

3.4.3. Untersuchungen zur Identifizierung von Zwischenprodukten und beteiligten Enzymen

3.4.3.1. Abbau von ^{14}C-markiertem L-Laktat im zellfreien Extrakt

Aus aerob gezogenen Zellen der stationären Phase wurde ein zellfreier Extrakt hergestellt, nach Dialyse unter Luftsauerstoff mit L-Laktat in Warburggefäßen inkubiert und der O_2-Verbrauch, die gebildeten Produkte sowie die Verteilung der Radioaktivität bestimmt.

Die Zahlen (Tab.7 und 8) zeigen deutlich, daß Laktat auch vom Rohextrakt unter O_2-Verbrauch zu Azetat und CO_2 abgebaut wird, wobei, wie aus den Ansätzen mit markiertem Laktat hervorgeht, CO_2 und Azetat im Verhältnis 1/1 entstehen, und zwar durch Abspaltung der Carboxylgruppe des Laktats, während C_2 und C_3 ins Azetat gelangen. Daneben werden geringe Mengen an Pyruvat gebildet. Abbildung 8 zeigt den zeitlichen Verlauf der O_2-Aufnahme und CO_2-Bildung: Wie schon bei den Versuchen mit lebenden Zellen, setzt auch hier die O_2-Aufnahme sofort nach Substratzusatz ein, während CO_2 erst nach einer lag-Phase freigesetzt wird. Das deutet daraufhin, daß Laktat zunächst unter O_2-Verbrauch zu einem Zwischenprodukt oxidiert wird, das erst nach Erreichen einer bestimmten Konzentration decarboxyliert wird.

3.4.3.2. Einfluß von Katalase auf den Laktatabbau

Da bei O_2-verbrauchenden biologischen Prozessen häufig H_2O_2 gebildet wird, lag die Vermutung nahe, daß dieses auch hier als End- oder Zwischenprodukt auftritt. Wenn ja, dann sollte es sich im Rohextrakt durch Katalase zerstören lassen, was zu einer Senkung des Netto-O_2-Verbrauchs führen müßte, da aus

Wasserstoffperoxid wieder Sauerstoff freigesetzt wird. Es wurden daher in einem Parallelansatz zum obigen Versuch gleichzeitig mit dem Laktat 400 µg Katalase zugesetzt, der O_2-Verbrauch gemessen und die entstandenen Produkte bestimmt.

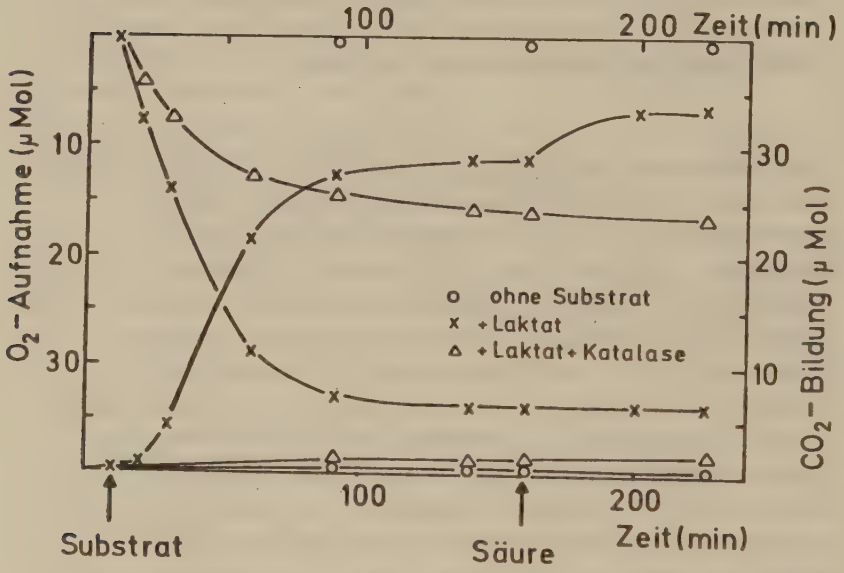

Abb.8:

Umsetzung von L-Laktat durch einen dialysierten Rohextrakt aus L.curvatus; Einfluß von Katalase auf den Umsatz. CO_2-Retention durch Säurezusatz berücksichtigt.

Wie aus Abbildung 8 und Tabelle 8 (Spalten III und III-I) hervorgeht, sinkt der O_2-Verbrauch in Gegenwart von Katalase

beträchtlich ab. Pro umgesetztem µMol Laktat wurde nur 1/2 µMol O_2 verbraucht, während das Verhältnis O_2/Laktat beim normalen Abbau bei 1 lag. Im Laufe der Reaktion wird also tatsächlich H_2O_2 gebildet, was bedeutet, daß an der Laktatoxidation eine H_2O_2-bildende Oxidase beteiligt ist.

Außerdem ergab der Versuch folgendes: Im Gegensatz zum Normalansatz ohne Katalase wird kein Azetat und CO_2 gebildet. Stattdessen entsteht eine dem Laktatverbrauch entsprechende Menge Pyruvat. H_2O_2 ist offenbar für die Bildung von Azetat und CO_2 nötig. Daß es bei dessen Zerstörung zu einer Anhäufung von Pyruvat kommt, legt die Vermutung nahe, daß auch beim normalen Umsatz neben H_2O_2 Pyruvat als Zwischenprodukt auftritt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß geringe Mengen Pyruvat auch beim normalen Abbau von Laktat durch Zellen und im Rohextrakt gefunden wurden. Dieses Pyruvat kann aber nur bei Vorhandensein von H_2O_2 zu Azetat und CO_2 weiter reagieren.

Der Laktatabbau läßt sich also folgendermaßen beschreiben:

(a) $\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Pyruvat} + H_2O_2$

(b) $\text{Pyruvat} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Azetat} + CO_2 + H_2O$

(c) $\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Azetat} + CO_2 + H_2O$

also eine Stöchiometrie entsprechend dem Beispiel der Streptokokken (London, 1968) und Mycobakterien (Sutton, 1954).

Bei Zusatz von Katalase wird das H_2O_2 zerstört, so daß Reaktion b nicht möglich ist. Stattdessen sinkt der Netto-O_2-Verbrauch auf die Hälfte des nach Gleichung c zu erwartenden. Es kommt also nur zu folgenden Reaktionen :

$$\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Pyruvat} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \longrightarrow 1/2\ O_2 + H_2O$$

$$\text{Laktat} + 1/2\ O_2 \longrightarrow \text{Pyruvat} + H_2O$$

Wie Tabelle 8 zeigt (Spalte II-I), wurde der größte Teil des abgebauten Laktats nach Gleichung c zu den Endprodukten CO_2 und Azetat umgesetzt, während ein geringer Anteil nach Gleichung a nur bis zum Pyruvat reagierte ,was den gegenüber CO_2 leicht erhöhten O_2-Verbrauch erklärt. Die Reaktionslösung enthält also wahrscheinlich noch Spuren von H_2O_2.

Aus dem bisherigen geht hervor, daß der Abbau des Laktats in mindestens zwei Reaktionsschritten erfolgt: Das Laktat wird zunächst unter O_2-Verbrauch und H_2O_2-Bildung oxidiert, wobei wahrscheinlich intermediär Pyruvat auftritt. Der Carboxylkohlenstoff wird anschließend von H_2O_2 unter Bildung von CO_2 und Azetat decarboxyliert.

Tab.7: Verteilung der Radioaktivität bei Oxidation von L-Laktat durch einen dialysierten Rohextrakt aus L. curvatus

Markierung des Laktats	Einsatz	CO_2			Azetat			zu CO_2 und Azetat umges. Aktiv. = "X"	nicht wasserdampfflüchtige Säuren		Protein		flüchtige Neutralprod.		Ausbeute
	$\times 10^3$ cpm	$\times 10^3$ cpm	%	% von "X"	$\times 10^3$ cpm	%	% von "X"	$\times 10^3$ cpm	$\times 10^3$ cpm	%	$\times 10^3$ cpm	%	$\times 10^3$ cpm	%	%
U-^{14}C	1433	45o	3o	34,4	92o	61,5	7o	13o5	128	8,5	o,1	o,o1	o,1	o,o1	1o3
1-^{14}C	2356	2218	91,5	1o3	1,5	o,o6	o,o7	215o	2o4	8,4	o,1	o,oo4	o,2	o,o1	1o2
3-^{14}C	123o	o,7	o,o6	o,o7	1o9o	88,5	98	1115	115	9,3	o,1	o,o1	o,2	o,o2	98

Tab.8: Enzymatisch bzw. manometrisch bestimmte Bilanz des Laktatumsatzes durch einen dialysierten Rohextrakt aus L. curvatus; Einfluß von Katalase auf den Umsatz. Alle Angaben in µMol.

Spalte	Bedingung	O_2-Verbrauch	CO_2	Azetat	Pyruvat	Laktat		umgesetztes Laktat
						L	D	
I	endogener Umsatz bis Substratzugabe	0	o,5	0	o,44	o,65	o,16	-
II	36,3 µMol L-Laktat zugesetzt	34,7	33,6	31,3	1,84	o,93	o,96	34,4
II-I	Umsatz ab Substratzusatz	34,7	33,1	31,3	1,4	o,28	o,8	35,2
III	36,3 µMol L-Laktat + Katalase	16,1	1,6	0	32,4	1,85	1,44	33
III-I	Umsatz ab Zug. von Laktat + Katalase	16,1	1,1	0	32,o	1,2	1,28	33,8
IV	Kontrolle ohne Substrat	o,3	o,7	0	o,44	o,62	o,5	-

3.4.3.3. Einfluß von Hydroxylamin auf den Laktatumsatz

Es bleibt die Frage, ob Pyruvat wirklich als freies Zwischenprodukt oder in gebundener Form auftritt. Es wäre z.B. denkbar, daß es an einem Enzym gebunden bleibt und in dieser Form von H_2O_2 angegriffen wird, daß dieser Komplex aber bei Fehlen des Reaktionspartners (also bei Zerstören des H_2O_2) in Enzym und Pyruvat zerfällt.

Nun gibt es Reagenzien, mit denen man freie Carbonylverbindungen wie Pyruvat abfangen und damit der Folgereaktion entziehen kann. Eine solche Verbindung ist z.B. Hydroxylamin, das mit Pyruvat sehr leicht ein Oxim bildet. Wenn beim Laktatabbau Pyruvat als freies Zwischenprodukt auftritt, sollte es bei Zusatz von Hydroxylamin gebunden werden, und die Weiterreaktion zu Azetat und CO_2 sollte ausbleiben, der respiratorische Quotient (CO_2/O_2) also sinken. Bei der Laktatoxidase der Mycobakterien, bei der es sich um ein bifunktionelles Enzym handelt, das Laktat sowohl oxidiert als auch decarboxyliert, wobei Azetat und CO_2 entstehen, hat Hydroxylamin keinen Einfluß auf den respiratorischen Quotienten (Sutton, 1957). Hier tritt Pyruvat nicht als freies Zwischenprodukt auf, obwohl spektroskopische Untersuchungen zeigten, daß intermediär ein Enzym-Pyruvat-Komplex auftritt (Lockridge et al., 1972).

Der Versuch wurde mit einem dialysierten Rohextrakt durchgeführt. Es wurde der L-Laktatumsatz bei bzw. ohne Zusatz eines Überschusses Hydroxylamin anhand von O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung untersucht. Um Störungen der manometrischen CO_2-Bestimmung durch eine eventuelle Reaktion des entstehenden H_2O_2 mit Hydroxylamin zu umgehen, wurde radioaktives Laktat (1-^{14}C-Laktat) eingesetzt und das gebildete $^{14}CO_2$ gemessen.

Wie aus Tabelle 9 (Spalte I) hervorgeht, erfolgte die O_2-Aufnahme bei Zusatz von Hydroxylamin fast um die Hälfte langsamer. Die CO_2-Bildung wird fast völlig unterdrückt (Spalte III), obwohl eine dem O_2-Verbrauch entsprechende Menge an Laktat verbraucht wurde. Man muß annehmen, daß zunächst Pyruvat entstanden war, welches aber vom Hydroxylamin zum größten Teil gebunden wurde und deshalb vom gleichzeitig gebildeten H_2O_2 nicht decarboxyliert werden konnte.

Wenn diese Annahme zutrifft, und unter diesen Bedingungen kein anderer Abbauweg vorlag, so sollte die Lösung noch H_2O_2 enthalten. Es wurde daher bei beiden Ansätzen Katalase zugekippt, wodurch bei dem Ansatz mit Hydroxylamin innerhalb weniger Minuten 2,1 µMol O_2 aus dem H_2O_2 entwickelt wurden, während beim Normalansatz nur ein geringer Druckanstieg erfolgte (Spalte II). Das heißt, daß beim Ansatz mit Hydroxylamin 4,2 µMol H_2O_2 vorgelegen hatten, was dem theoretisch zu erwartenden Wert von 4,6 µMol (5,1 - o,5; Tab.9) sehr nahe kommt. Aus dem Versuch geht hervor, daß der Laktatabbau bei L. curvatus über intermediäre Freisetzung von H_2O_2 und Pyruvat erfolgt und sich dadurch von dem bei Mycobakterien gefundenen Weg unterscheidet.

3.4.3.4. Azetatbildung aus Pyruvat und H_2O_2

Es ist schon lange bekannt, daß sich Pyruvat und H_2O_2 spontan zu Azetat und CO_2 umsetzen (Sutton, 1954). Es ist daher nicht unbedingt ein Enzym zur Katalyse erforderlich. Dies wurde durch folgenden Versuch demonstriert :

Aus einer Pufferlösung mit 6 µMol Pyruvat (3 µMol/ml) wurden nach Zukippen von 2o µMol H_2O_2 (Endkonz. 1o µMol/ml) 6 µMol CO_2 praktisch genauso schnell freigesetzt wie aus dem

Tab.9: Einfluß von Hydroxylamin auf den Laktatumsatz; Bilanz 3 h nach Substratzusatz;
Pro Gefäß o,5 ml dialysierter Rohextrakt in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; 3o°C;
Substrat : 9,3 µMol 1-^{14}C-L-Laktat à 279ooo cpm
a) nur Substrat gekippt
b) 5o µMol Hydroxylamin zusammen mit Substrat gekippt ($H_2NOH \cdot HCl$ mit NaOH ad pH 6,5)
Endvolumen 2 ml; Katalasezusatz je 1 mg
Kontrollen ohne Substratzusatz zeigten keine Druckänderungen
CO_2-Retention durch Säurezusatz berücksichtigt

Spalte	I	II	III				IV
Bedingung	O_2-Konzentrationsänderung (µMol)		CO_2-Bildung		% Decarboxylation		Laktatverbrauch (µMol)
	vor Katalasezusatz	nach Katalasezusatz	µMol	cpm	% von µMol	% von cpm	
a) ohne Hydroxylamin	- 8,6	+ o,35	7,9	24oooo	84,5	86	8,8
b) mit Hydroxylamin	- 5,1	+ 2,1	o,5	84oo	5,3	3	4,8

gleichen Volumen eines gegen diesen Puffer dialysierten Rohextraktes (Abb.9). Der Rohextrakt bewirkt also keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

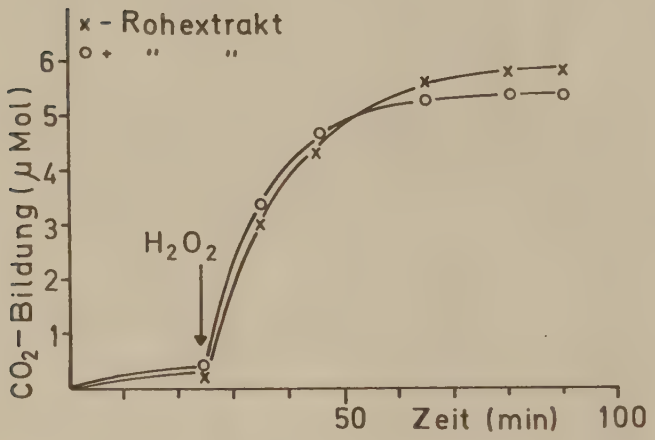

Abb.9:

Decarboxylierung von Pyruvat durch H_2O_2 mit bzw. ohne Zusatz von Rohextrakt.

6 µMol Pyruvat und 2o µMol H_2O_2; CO_2-Retention durch α' berücksichtigt.

3.4.3.5. Abhängigkeit des Laktatabbaus vom Gehalt an endogenen Faktoren des Rohextraktes

Wie die Versuche 3.4.2.1. und 3.4.3.1. zeigen, führt der Abbau von Laktat sowohl in Zellen wie im dialysierten Rohextrakt zu Azetat und CO_2. Unter der Voraussetzung, daß der Abbauweg in den Zellen und im Rohextrakt der gleiche ist, kann man annehmen, daß am Reaktionsablauf keine Coenzyme beteiligt sind.

Ein Vergleich des Laktatabbaus durch einen Rohextrakt vor und nach Dialyse zeigte zusätzlich, daß eine Verarmung an endogenem Material keinen Einfluß auf den Umsatz hat (vergl. Tab.1o). Auch die Kinetik des O_2-Verbrauchs und der CO_2-Entwicklung waren beim dialysierten und nicht dialysierten Rohextrakt gleich.

Tab.1o: Einfluß der Dialyse auf den Laktatabbau durch Rohextrakt aus L. curvatus.
Einsatz: 38 µMol L-Laktat.
Die Werte sind mit den bis zur Substratzugabe erhaltenen Werten korrigiert. Der endogene Stoffwechsel (O_2-Verbrauch, CO_2- und Azetatbildung) war bei Zusatz des Substrates beendet, wie Kontrollen ohne Substratzusatz zeigten.
CO_2-Retention durch Säurezusatz berücksichtigt.

	O_2-Verbrauch µMol	CO_2-Bildung µMol	Azetat µMol
dialysierter Rohextrakt	31,4	33	3o,9
nicht dialysierter Rohextrakt	32,8	32,9	33,o

An der Laktatoxidation und den damit verbundenen Elektronenübertragungen scheinen somit keine Coenzyme als Zwischenträger beteiligt zu sein. Der Sauerstoff greift das Laktat vielmehr direkt über eine Laktatoxidase an,und auch die weiteren Reaktionen laufen ohne Coenzymmitwirkung ab.

3.4.3.6. Nachweis einer L-Laktatoxidase im Rohextrakt von L.curvatus

3.4.3.6.1. Nachweis im optischen Test

Oxidasen lassen sich, falls sie Sauerstoff zu H_2O_2 (und nicht zu H_2O) reduzieren, durch den unter Material und Methoden angegebenen optischen Test nachweisen. Mit Hilfe dieses Aktivitätstests, der auf der Messung der H_2O_2-Bildung beruht, konnte in Rohextrakten von L.curvatus tatsächlich eine L-spezifische Laktatoxidase nachgewiesen werden, wie die folgenden Versuche zeigen.

3.4.3.6.1.1. Nachweis von H_2O_2-Bildung in Gegenwart von L-Laktat

Der unter Material und Methoden angegebene Aktivitätstest wurde entsprechend Tabelle 11 variiert. Die Zahlen zeigen, daß es im Rohextrakt bei L-Laktatgegenwart, nicht jedoch bei D-Laktatzusatz, zu H_2O_2-Bildung kommt.

Tab.11: Nachweis von H_2O_2-Bildung bei L-Laktatzusatz im optischen Test.
lo µl dialysierter Rohextrakt eingesetzt.

Variation des Aktivitätstests	$lo^2 \cdot \Delta E/min$
L-Laktat als Substrat	4,o
D-Laktat als Substrat	o,ol
H_2O statt Substrat	o,ol
ohne Rohextrakt	o,ol

3.4.3.6.1.2. Abhängigkeit der H_2O_2-Bildung vom O_2-Partial-Druck

Die Testreagenzien für den optischen Test wurden (a) mit O_2 (b) mit N_2 ca. 1/2 h lang vorgespült, mit je lo µl Rohextrakt zusammengegeben, die Küvetten danach noch ca. 2 min mit O_2 bzw. N_2 gespült und dann luftdicht verschlossen. Nach etwa lo min hatte sich bei Ansatz (a) der Küvetteninhalt kräftig braun gefärbt, während bei Ansatz (b) nur eine leichte Brauntönung zu beobachten war. Die Reaktion ist also O_2-abhängig.

3.4.3.6.1.3. Bestimmung des Endproduktes

Zur Bestimmung des Endproduktes der Laktatoxidation im optischen Test wurden o,75 µMol 3,3-Diaminobenzidiniumtetrachlorid, 5 µMol L-Laktat, 1oo µg Meerrettichperoxidase in O_2-gesättigtem 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 mit bzw. ohne 5o µl Rohextrakt in 3,5 ml - Küvetten inkubiert. Nach Erreichen einer genügend hohen Extinktionsänderung wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 Tropfen 1o N H_2SO_4 gestoppt und nach Zentrifugieren und Neutralisation auf Laktat und Pyruvat getestet. Die korrigierten Werte sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tab.12: Bestimmung des Endproduktes beim optischen Laktatoxidase-Test

L-Laktat-Verbrauch	Pyruvat-Bildung	Farbstoff-Bildung
1,38 µMol	1,32 µMol	o,65 µMol

Das Laktat wird also vollständig zu Pyruvat umgesetzt.

Diese Versuche zeigen, daß L. curvatus eine L-Laktatoxidase besitzt, die L-Laktat unter O_2-Verbrauch zu Pyruvat und H_2O_2 oxidiert, also die unter 3.4.3.2. angegebene Reaktion (a) ermöglicht.

3.4.3.6.2. Nachweis der Laktatoxidase durch Diskelektrophorese

Die Laktatoxidase konnte nach Polyacrylamid-Diskelektrophorese auf dem Gel durch Aktivitätsfärbung nachgewiesen werden. Bei Inkubation der Gele mit einer L-Laktat, Peroxidase und 3,3-Diaminobenzidiniumtetrachlorid enthaltenden Entwickler-

lösung war nach einigen Minuten eine scharfe braune Bande auf farblosem Hintergrund zu sehen, die nach längerem Stehen der Gele allerdings immer verwaschener wurde. Bei Weglassen des L-Laktats oder Ersatz durch D-Laktat bildete sich keine Bande. Zur Standardisierung der elektrophoretischen Beweglichkeit des Enzyms wurde die L-LDH aus Kaninchenherz (= LDH Iso I) als Referenz aufgetragen. $R_{Kaninchen}$ = Wanderungsstrecke der Oxidase / Wanderungsstrecke der LDH betrug 1.18.

3.4.3.7. Untersuchung der L-Laktatoxidase von L.curvatus

Wahrscheinlich ist die L-Laktatoxidase - eventuell gekoppelt mit einer Pyruvatperoxidase - für die bei Zellen und im Rohextrakt beobachtete Oxidation des Laktats verantwortlich. Doch ist der Abbau des Laktats im Prinzip auch anders denkbar. Insbesondere ist eine Beteiligung der von Stetter (1973) beschriebenen und von Hensel et al. (1977 a,b) eingehend untersuchten hochaktiven L-Laktatdehydrogenase von L. curvatus an diesem Stoffwechselweg vorstellbar. Dieses Enzym greift zwar in erster Linie Pyruvat an, das mit NADH zu Laktat reduziert wird. Doch zeigt es auch mit Laktat als Substrat eine gewisse Aktivität. Vorstellbar wäre etwa eine Kopplung der LDH mit einer NADH-Oxidase, die verbrauchtes NAD unter O_2-Verbrauch wieder regenerieren würde, so daß auch mit Spuren von NADH, wie sie selbst in dialysierten Extrakten noch vorliegen könnten, ein deutlicher Laktatumsatz möglich sein sollte. NADH-Oxidase-Aktivität wurde bei L. curvatus tatsächlich gefunden (unveröffentlichte Ergebnisse).

Im folgenden sollte nun die L-Laktatoxidase angereichert werden, um eine bessere Charakterisierung dieses Enzyms zu ermöglichen. Außerdem sollte durch Anreicherung sicher-

gestellt werden, daß diese Oxidase tatsächlich an dem in Versuch 3.4.3.1. beschriebenen Abbau des Laktats beteiligt ist. So würde sich etwa durch Abtrennung der LDH die Mitwirkung der LDH am Laktatabbau eindeutig ausschließen lassen.

Durch Anreicherung der Oxidase erhofften wir uns außerdem einen Hinweis auf die Frage, ob die Weiterreaktion der Zwischenprodukte Pyruvat und H_2O_2 spontan oder enzymkatalysiert abläuft. Eine eventuell vorhandene, aber wegen der spontanen Reaktion von Pyruvat mit H_2O_2 nicht nachweisbare Pyruvatperoxidase sollte bei Anreicherung der Laktatoxidase allmählich verlorengehen, was sich auf die Kinetik der CO_2-Bildung auswirken könnte.

3.4.3.7.1. Vorversuche zur Anreicherung der Laktatoxidase

3.4.3.7.1.1. Stabilitätsversuche

3.4.3.7.1.1.1. Art des Puffers und optimaler pH

Ein gegen 10^{-2} M Phosphatpuffer pH 6,5 dialysierter Rohextrakt wurde mit verschiedenen o,1 M Puffern im Verhältnis 1/6 verdünnt und die Aktivität sofort sowie nach 6 Tagen Lagerung bei 4°C gemessen. Wie Abbildung 10 zeigt, ist die Oxidase in Azetatpuffer von pH 5,3 am stabilsten, sowie in Imidazolpuffer von pH 6,6. Weit geringer ist die Stabilität in Phosphatpuffer.

3.4.3.7.1.1.2. Kurzzeitstabilität bei verschiedenen pH-Werten

Ein dialysierter Rohextrakt wurde mit o,2 M Azetatpuffer von verschiedenem pH im Verhältnis 1/6 verdünnt. Nach 1 h Lagerung bei 0°C wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert und der Überstand getestet. Wie aus Abbildung 11 ersichtlich,

hatte die Aktivität bei pH 4,7 kaum abgenommen, und die Menge an abzentrifugiertem Protein deutete auf eine recht gute Anreicherung hin.

3.4.3.7.1.1.3. Variation der Pufferkonzentration

Ein gegen 10^{-2} M Imidazolpuffer pH 6,5 dialysierter Rohextrakt wurde mit Azetatpuffer pH 5,3 bzw. Imidazolpuffer pH 6,5 in verschiedenen Konzentrationen 1/10 verdünnt. Die nach 2 Wochen bei 4°C noch vorhandene Aktivität ist in Abbildung 12 dargestellt. In Imidazolpuffer sinkt unterhalb einer Konzentration von 0,05 Mol/l, in Azetatpuffer unterhalb 0,02 Mol/l die Stabilität infolge zu geringer Ionenstärke beträchtlich ab.

3.4.3.7.1.1.4. Hitzestabilität

Das Enzym zeigte sowohl in Azetatpuffer pH 5,3 als auch in Imidazolpuffer pH 6,5 nach 5 min Inkubation bei 60°C keine Aktivität mehr. Auch Zusatz von L-Laktat (0,02 M) stabilisierte das Enzym nicht.

3.4.3.7.1.1.5. Einfluß des O_2-Partialdruckes

Je 0,5 ml eines Rohextraktes wurden 24 h lang gegen je 200 ml 0,1 M Imidazolpuffer dialysiert, und zwar war der Puffer

a) luftgesättigt,
b) N_2-gesättigt,
c) luftgesättigt aber mit Mercaptoäthanol (0,5 ml/l) versetzt.

Die Aktivität sank im Fall (a) um 5 % und im Fall (b) um 10 %. Im Fall (c) betrug die meßbare Aktivität nur noch

25 % der Anfangsaktivität, was auf einer Schädigung des Enzyms beruhen kann, oder aber auf einer Störung des optischen Tests durch das in der eingesetzten Extraktmenge enthaltene Mercaptoäthanol, das ja Sauerstoff abfängt. Da die Oxidase kaum sauerstoffempfindlich ist, wurden im folgenden keine besonderen Schutzmaßnahmen mehr getroffen.

3.4.3.7.1.1.6. Abhängigkeit der Stabilität von der Verdünnung

Abbildung 13 zeigt die Stabilitätsabnahme eines dialysierten Rohextraktes mit der Verdünnung und zwar in 10^{-2} M Azetatpuffer pH 5,3 bzw. in 10^{-2} M Imidazolpuffer pH 6,5 (innerhalb von zwei Wochen). In Azetatpuffer nimmt die Stabilität erst unterhalb einer Proteinkonzentration von ca. 5 mg/ml sehr drastisch ab, während sie in Imidazolpuffer ziemlich stetig sinkt.

3.4.3.7.1.1.7. Stabilität beim Einfrieren

Ein dialysierter Rohextrakt wurde mit 10^{-2}M Azetatpuffer pH 5,3 bzw. 10^{-2} M Imidazolpuffer pH 6,5 im Verhältnis 1/25 verdünnt und mit den in Tabelle 13 angegebenen Zusätzen 14 Tage lang bei -18°C gelagert. Wie aus der Tabelle hervorgeht, reagierte die Oxidase sehr empfindlich auf das Einfrieren ohne Zusatz. Während in Azetatpuffer auch Zusatz von Rinderserumalbumin und Glyzerin nur eine geringe Steigerung der Stabilität bewirkten, ließ sich das Enzym in Imidazolpuffer durch Glyzerin, vor allem aber durch Saccharose gut stabilisieren.

3.4.3.7.1.2. Ammonsulfatfällung

Bei einer Ammonsulfatfällung in o,2 M Azetatpuffer pH 5,3 fielen 7o % des Enzyms zwischen 5o und 7o % Sättigung aus.

3.4.3.7.1.3. Affinitätschromatographie der Oxidase mit Oxamatsepharose

3.4.3.7.1.3.1. Vorversuche

Hemmung der Oxidase durch Pyruvat und Oxamidsäure:
Es zeigte sich, daß die Laktatoxidase durch Pyruvat, also durch ein Reaktionsprodukt, hemmbar ist. In Gegenwart von 6 mM Pyruvat zeigte das Enzym nur 18 % der Aktivität. Bei Erhöhung der Laktatkonzentration im Test auf das Fünffache stieg die Aktivität wieder auf 35 % der ursprünglichen. Das Reaktionsprodukt (Pyruvat) und das Substrat (Laktat) konkurrieren also offenbar um das aktive Zentrum des Enzyms.

Auch Oxamidsäure, das in seiner Struktur dem Pyruvat ähnelt, bewirkte eine Hemmung der Oxidase. In Gegenwart von 1o mM Oxamat sank die Aktivität auf 14 % ab. Auch diese Hemmung war durch Laktatzusatz zum Teil revertierbar. Oxamat hat also wahrscheinlich die gleiche Anhaftstelle wie Pyruvat.

3.4.3.7.1.3.2. Säulenchromatographie der Oxidase

Die Hemmbarkeit der Laktatoxidase durch Oxamidsäure ließ uns vermuten, daß das Enzym an Oxamatsepharose binden würde. Da Pyruvat das Enzym ebenfalls "binden" konnte, sollte die Oxidase bei einer genügend hohen Pyruvatkonzentration wieder vom Gel eluierbar sein.

Es wurden daher 5,2 ml eines gegen o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 dialysierten Rohextraktes auf eine Oxamatsepharose-

säule (34 ml Bettvolumen in o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5) aufgetragen. Das Protein wurde in drei Stufen eluiert:

1.) mit o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 ohne Zusatz,
2.) wie unter 1.), aber mit o,2 M Pyruvat,
3.) wie unter 1.), aber mit o,4 M Pyruvat.

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, wird auf diese Art die LDH vollständig von der Laktatoxidase abgetrennt. Die Fraktionen 51-54 wurden vereinigt und eingeengt. Nach Dialyse wurde die Aktivität bestimmt. (Die wahre Aktivität ist wegen des durch Pyruvat hervorgerufenen Hemmeffektes erst nach Dialyse meßbar.) Die Ausbeute an Oxidase betrug bei einer 3-fachen Anreicherung 4o %, die an LDH o,4 % (nach Dialyse o,14 %) (Tab.14).

Bei Eluation der Oxidase mit NaCl (o,8 M) statt Pyruvat konnte das Enzym nicht von der LDH abgetrennt werden. Außerdem betrug die Enzymausbeute nur 2o %.

Tab.13: Stabilisierung durch Zusätze beim Einfrieren.
Angaben: % der eingesetzten Aktivität

Zusätze \ Puffer	Azetat	Imidazol
-	16	8
Rinderserumalbumin (5 mg/ml)	4o	25
Glyzerin (1o %ig)	3o	6o
Saccharose : o,1 M	16	7o
o,5 M	n.g.	1oo

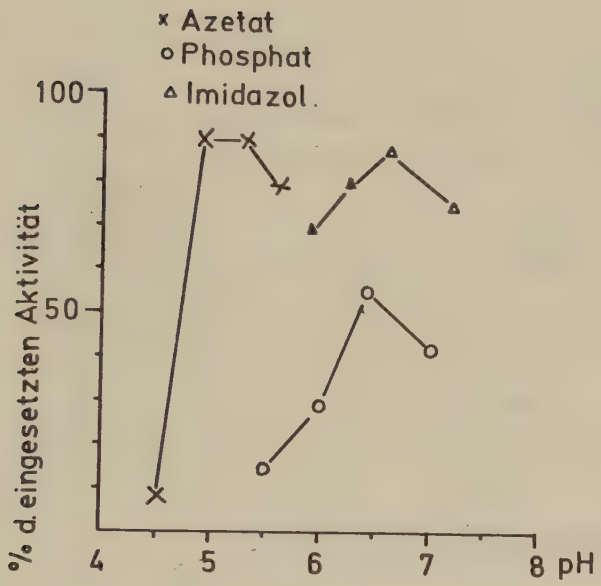

Abb.1o:
pH-Abhängigkeit der Stabilität in verschiedenen Puffern

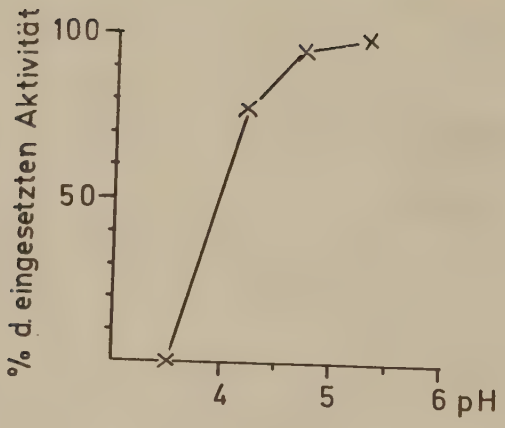

Abb.11:
Kurzzeitstabilität in Azetatpuffer bei verschiedenen pH-Werten

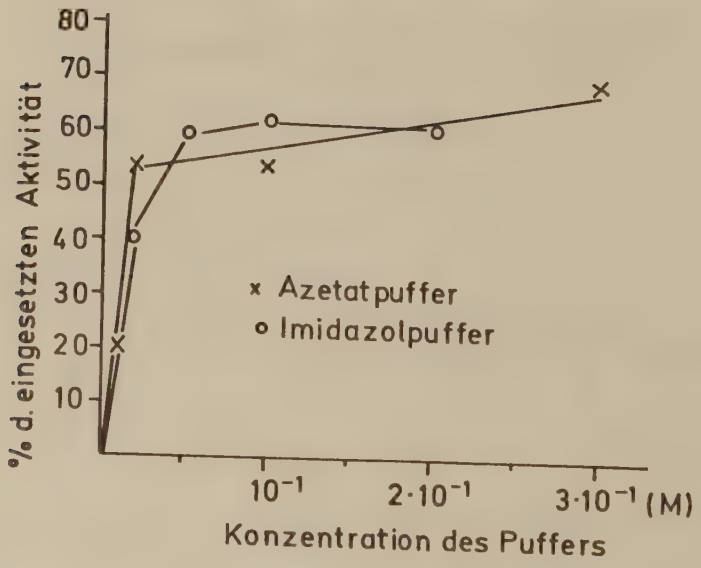

Abb.12:
Abhängigkeit der Stabilität von der Pufferkonzentration

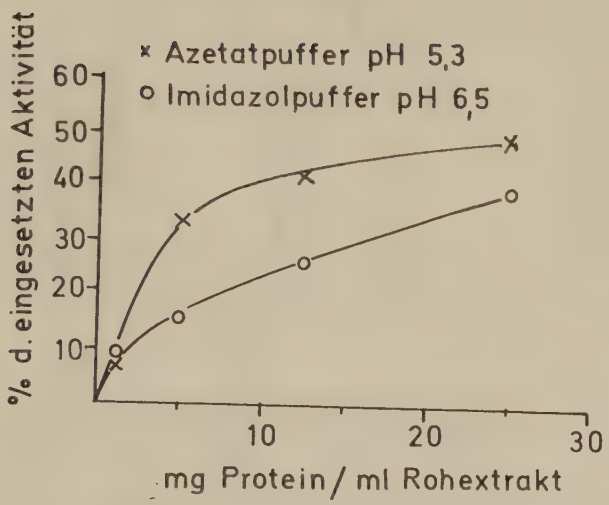

Abb.13:
Abhängigkeit der Stabilität von der Verdünnung

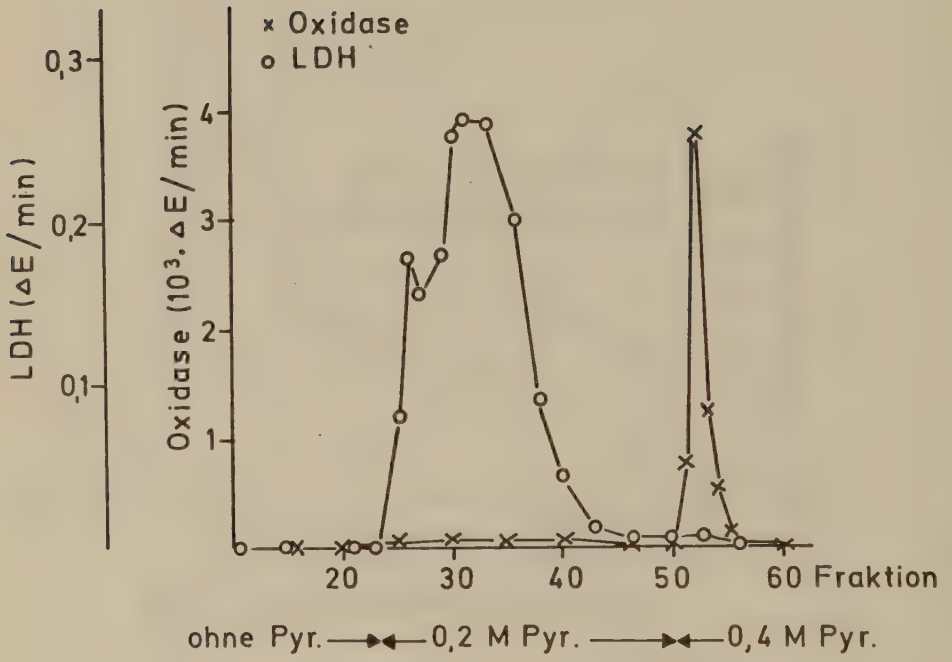

Abb. 14:

Säulenchromatographie der Oxidase auf Oxamatsepharose

Tab.14: Trennung von Laktatoxidase und NAD-abhängiger L-LDH über Affinitätschromatographie

Fraktion	Laktatoxidase				LDH	
	Gesamt-aktiv.	spezif. Aktiv.	Anrei-cherg.	Aus-beute	Gesamt-aktiv.	Aus-beute
dialysierter Rohextrakt	12,1	o,o3	1	1oo	13oo	1oo
Affinitätschromatogr.	n.g.	-	-	-	5,1	o,4
Einengen + Dialyse	4,8	o,o93	3,1	4o	1,8	o,14

3.4.3.7.2. Anreicherung der Laktatoxidase

8o g tiefgefrorene Zellen (aerobe Anzucht; stationäre Phase*) wurden mit o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 in der Frenchpress aufgeschlossen, zentrifugiert und der Rohextrakt mit o,2 M Azetatpuffer pH 4,7 im Verhältnis 1/5 verdünnt ("Säurefällung"). Nach einer Stunde bei 0°C wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert, der Überstand mit NaOH auf pH 5,3 eingestellt und eine Ammonsulfatfällung durchgeführt. Es wurden Fraktionen von 0-5o und 5o-7o % Sättigung geschnitten. Fraktion 0-5o %, sowie der Überstand von Fraktion 5o-7o % enthielten praktisch keine Aktivität. Fraktion 5o-7o % wurde gegen o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 dialysiert und eingeengt.

* Wie unter 3.4.4.1. dargestellt, ist unter diesen Bedingungen der Gehalt der Zellen an Enzym am höchsten.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie über eine Oxamatsepharosesäule. Nach einem Vorlauf ohne Zusatz von Pyruvat wurde die LDH mit o,2 M Pyruvat eluiert und die Laktatoxidase schließlich mit o,4 M Pyruvat. Die schwach gelb gefärbten oxidasehaltigen Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt, gegen o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 dialysiert und nach Zusatz von Saccharose (o,5 M) eingefroren.

Tabelle 15 zeigt den Verlauf der Anreicherung und die Abtrennung der LDH. Die Oxidase wurde 17-fach angereichert. Die Ausbeute betrug 14,5 %. Die relativ hohen Verluste bei der Affinitätschromatographie sind wohl hauptsächlich auf die starke Verdünnung des Enzyms zurückzuführen. Die Aktivität der LDH sank auf etwa 1/6ooo ab. Die Aktivität der Oxidase stieg gegenüber der Aktivität der LDH fast um den Faktor looo.

3.4.3.7.2.1. Kinetische Untersuchungen zur Enzymanreicherung

3.4.3.7.2.1.1. Abhängigkeit des Gasumsatzes von der Proteinmenge

Um die einzelnen Fraktionen der Laktatoxidaseanreicherung hinsichtlich ihrer O_2-Aufnahmeaktivität vergleichen zu können, mußte zunächst festgestellt werden, welcher Zusammenhang zwischen der im optischen Test gemessenen H_2O_2-Bildungsaktivität und dem im Warburg gemessenen O_2-Verbrauch eines Rohextraktes besteht. Dazu wurden verschiedene Mengen eines dialysierten Rohextraktes, dessen Laktatoxidase-Aktivität bekannt war, auf ihren O_2-Verbrauch hin untersucht. Parallel dazu wurde auch die CO_2-Bildung gemessen. Ein Warburggefäß enthielt in 2,3 ml o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 lo-loo µl Rohextrakt und lo µMol L-Laktat. Der Umsatz fand bei 25°C unter Luftsauerstoff bei einer Schüttelfrequenz von 76 Ausschlägen/min statt.

Tab.15: Anreicherung der L-Laktatoxidase mit Abtrennung der LDH
* in U/mg Protein; ** = spez. Aktivität der Fraktion/spez. Aktivität des Rohextraktes;
*** = Gesamtaktivität der Oxidase / Gesamtaktivität der LDH

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	L-Laktatoxidase					Laktatdehydrogenase			
			U/ml	Gesamt-aktiv.	spez. Akt.*	Anrei-cherg.**	Ausbeu-te(%)	U/ml	Gesamt-aktiv.	Ausbeu-te (%)	Oxidase/ LDH***
Rohextrakt	44	73	2,o4	9o	o,o28	1	1oo	586	263oo	1oo	o,oo34
Überstand nach "Säure-fällung"	2oo	5,2	o,35	69	o,o67	2,4	77	n.g.	-	-	-
Ammonsulfatf.: Fr.5o-7o %	48	n.g.	1,17	56	-	-	62	118	57oo	22	o,o12
Fr.5o-7o % dial.u.eingeengt	1o	3o,2	5,14	51,4	o,17	6	57	228	23oo	9	o,o22
nach Ox.Seph. eingeengt u. dialysiert	3	9,3	4,35	13,1	o,47	17	14,5	1,43	4,3	o,o16	3,o5

Wie Abbildung 15 (Teil A) zeigt, erfolgte die O_2-Aufnahme nur während relativ kurzer Zeit mit konstanter Geschwindigkeit, verlangsamte sich dann aber um so schneller, je höher die Anfangsgeschwindigkeit war. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, besteht eine lineare Abhängigkeit der O_2-Aufnahmerate (gemessen in der linearen Anfangsphase) von der eingesetzten Proteinmenge und zwar bis etwa V_o = 3 µMol O_2/h, was bei diesem Rohextrakt einer Oxidaseaktivität von o,1 U entsprach.

Aus Abbildung 15 (Teil B) geht hervor, daß CO_2 erst nach einer lag-Phase gebildet wird. Das war auch in früheren Versuchen festgestellt worden. Ein Vergleich von Teil A mit Teil B zeigt außerdem deutlich, daß die CO_2-Bildung hinter der O_2-Aufnahme "herhinkt" und zwar um so stärker, je mehr Protein eingesetzt wurde. Das bedeutet aber, daß es intermediär zu einem Anstau der Zwischenprodukte Pyruvat und H_2O_2 kommt, und diese treten in um so höheren Konzentrationen auf, je rascher die O_2-Aufnahme erfolgt, also je mehr Protein eingesetzt wurde. Das angehäufte Pyruvat, das wie aus Versuch 3.4.3.7.1.3. hervorgeht, die Laktatoxidase - wahrscheinlich kompetetiv - hemmt, kann daher wohl auch für das hier beobachtete rasche Absinken der O_2-Aufnahmegeschwindigkeit verantwortlich gemacht werden. Da die hemmende Wirkung des Pyruvats auf die Laktatoxidase bei Erhöhen der Laktatkonzentration gesenkt wird, ließen sich die linearen Phasen der O_2-Aufnahme durch höhere Laktatkonzentrationen, also ein günstigeres Laktat / Pyruvat-Verhältnis, wahrscheinlich verlängern.

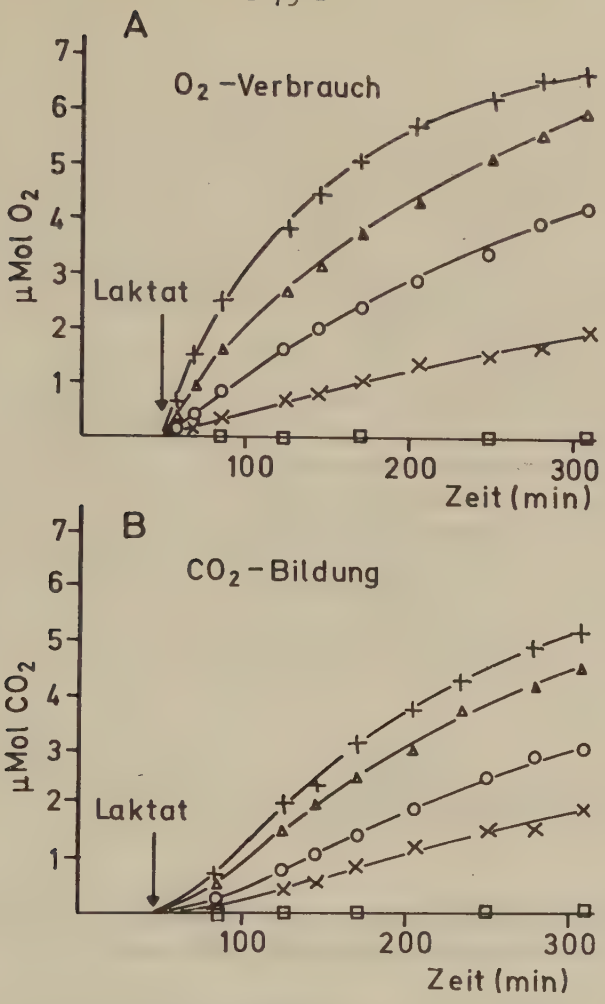

Abb.15:

Kinetik der O_2-Aufnahme (A) und CO_2-Bildung (B) bei verschiedenen Proteinmengen (im Rohextrakt). CO_2-Retention durch α' berücksichtigt.

Symbol	Laktatoxidase	
	U	µl Rohextrakt
+	o,2	1oo
△	o,1	5o
o	o,o5	25
×	o,o2	1o
□	o,o	o

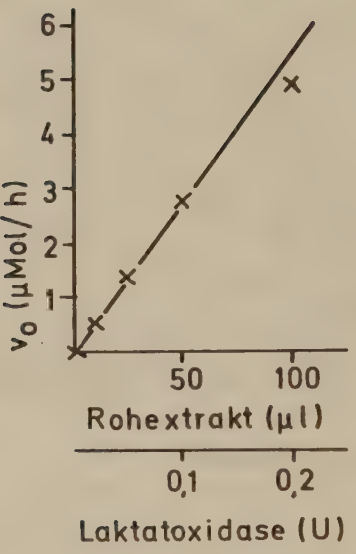

Abb.16:

Abhängigkeit der O_2-Aufnahmerate von der Proteinmenge und der Laktatoxidase-Aktivität.

3.4.3.7.2.1.2. Untersuchung des Gasaustausches der einzelnen Fraktionen der Enzymanreicherung

Parallel zur Anreicherung der Laktatoxidase wurde die Kinetik des O_2-Verbrauchs und der CO_2-Bildung gemessen. Folgende Fraktionen wurden untersucht:

a) der Rohextrakt,

b) der auf pH 5,3 titrierte Überstand nach der Säurefällung. Von diesen beiden Fraktionen wurde jeweils ein Aliquot gegen o,o5 M Imidazolpuffer pH 6,5 dialysiert.

c) die Hauptfraktion der Ammonsulfatfällung nach Dialyse (o,o5 M Imidazolpuffer) und Einengen,
d) die nach Reinigung mit Oxamatsepharose erhaltene eingeengte und dialysierte Fraktion (o,o5 M Imidazolpuffer).

Der Testansatz war der gleiche wie in Versuch 3.4.3.7.2.1.1. Von jeder Fraktion wurden o,o9 U Laktatoxidase eingesetzt.

Abbildung 17 zeigt den zeitlichen Verlauf des O_2-Verbrauchs und der CO_2-Produktion des Rohextraktes und der nach Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktion. Die Kinetik des Gasaustausches ist in beiden Fraktionen praktisch identisch. Auch die anderen untersuchten Fraktionen zeigten das gleiche Verhalten. Die während der anfänglichen linearen Phase des O_2-Verbrauches beobachteten Geschwindigkeiten sind in Tabelle 16 angegeben. Die Werte sind für alle Stufen der Anreicherung praktisch gleich und stimmen mit der aus Versuch 3.4.3.7.2.1.1. für o,o9 U sich ergebenden O_2-Aufnahmerate von 2,4 µMol/h nahezu überein.

Tab.16: O_2-Aufnahmeraten der Fraktionen der Laktatoxidase-Anreicherung.

Fraktion	v_o (µMol O_2/h)
Rohextrakt	2,1
nach "Säurefällung"	2,3
nach Ammonsulfat-Fällung	2,o
nach Affinitätschromatogr.	2,15

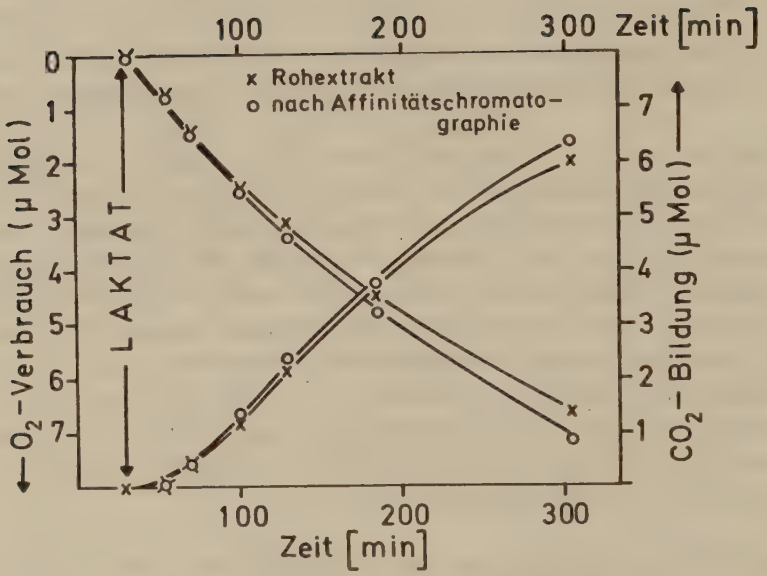

Abb.17:

Kinetik des Gasaustausches von Rohextrakt und angereicherter Laktatoxidase. CO_2-Retention durch α' berücksichtigt.

Gemessen an der H_2O_2-Bildung gleiche Mengen Laktatoxidase, zeigten also trotz unterschiedlichen Proteingehaltes auch gleiche O_2-Verbrauchsraten. Mit der Anreicherung der Laktatoxidase nimmt also die Anreicherung der Sauerstoff-verbrauchenden Aktivität stöchiometrisch zu. Dies bedeutet, daß die Laktatoxidase einzig und allein für den O_2-Verbrauch des Rohextraktes bei Laktatzusatz verantwortlich ist.

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, blieb der Quotient CO_2/O_2 auch nach Anreicherung der Oxidase zu jedem Zeitpunkt der Reaktion gleich wie im Rohextrakt. Das spricht dafür, daß die Folgereaktion - nämlich die Bildung von Azetat und CO_2 aus Pyruvat und H_2O_2 - spontan und nicht enzymkatalysiert abläuft. Denn eine eventuell vorhandene Pyruvatperoxidase sollte im Laufe der Anreicherung der Laktatoxidase verlorengegangen sein, was sich durch eine Verlangsamung der CO_2-Bildung gegenüber dem O_2-Verbrauch, also ein Absinken des CO_2/O_2-Wertes ausdrücken sollte.

3.4.3.7.2.2. Bilanz des Laktatabbaus durch die angereicherte Laktatoxidase

Wie aus obigem Versuch hervorgeht, setzt die angereicherte Laktatoxidase L-Laktat wie ganze Zellen oder ein Rohextrakt unter O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung um. Es sollte nun die Bilanz dieses Abbaus untersucht werden. Dazu wurde L-Laktat in Warburggefäßen mit o,25 U der angereicherten Laktatoxidase in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 bei 3o°C inkubiert und der O_2-Verbrauch sowie die CO_2-Bildung gemessen. Anschließend wurden die Produkte enzymatisch bestimmt.

Das Ergebnis der Messungen ist in Tabelle 17 dargestellt. Wie aus Spalte II ersichtlich, enthielt die Enzymfraktion noch geringe Mengen an Pyruvat, die von der Elution des Enzyms von der Oxamatsepharosesäule stammten. Nach Korrektur (Spalte I-II) ergibt sich, daß der größte Teil des Laktats (ca. 8 µMol) oxidativ zu Azetat und CO_2 abgebaut wird - entsprechend der Gleichung:

$$\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Azetat} + CO_2 + H_2O$$

Ein geringer Anteil (ca. o,5 µMol) wird nur bis zum Pyruvat umgesetzt - nach der Gleichung :

$$\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Pyruvat} + H_2O_2$$

Das Laktat wird also in gleicher Weise abgebaut wie im zellfreien Extrakt (Versuch 3.4.3.1.) und durch lebende Zellen (Versuch 3.4.2.1.).

Die letzten beiden Versuche zeigen auch eindeutig, daß die L-LDH an dieser Oxidation des Laktats nicht beteiligt ist, denn die Abtrennung der LDH hat keinen Einfluß auf den Laktatabbau. Vielmehr ist die Laktatoxidase (zusammen mit einer spontanen Reaktion) für die Oxidation des Laktats verantwortlich.

3.4.3.7.2.3. Bestimmung der Michaeliskonstanten für Laktat

Die Bestimmung der Michaeliskonstanten erfolgte mit dem angereicherten Enzym. Es wurde der optische Test verwendet, jedoch mit verschiedenen Laktatkonzentrationen. Abbildung 18 zeigt die Sättigungskurve und die Lineweaver-Burk-Darstellung (Lineweaver et al., 1934), aus der sich ein K_M von $6{,}95 \times 10^{-4}$ M ergibt.

3.4.3.7.2.4. Abhängigkeit der Aktivität von der Art des Puffers und dem pH

Die Tests wurden mit der angereicherten Enzymfraktion durchgeführt. Es wurde der Standardtest verwendet, jedoch mit verschiedenen Puffern (o,1 M).

Tab.17: Abbau von Laktat durch die angereicherte Laktatoxidase.
Alle Angaben in µMol. CO_2-Retention durch Säurezusatz berücksichtigt.

Spalte	Bedingung	O_2	CO_2	Azetat	Pyruvat	Laktat		Ausbeute
						L	D	
I	+ 9,55µMol L-Laktat	8,47	8,07	7,9	0,79	0,6	0,01	-
II	Kontrolle ohne Substrat	-	-	-	0,25	-	-	-
I-II	nach Korrektur	8,47	8,07	7,9	0,54	0,6	0,01	96 %

a) pH-Optimum der Aktivität in Phosphatpuffer.
Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, liegt das Optimum für den Laktatumsatz bei etwa 6,3.

b) Vergleich Phosphatpuffer / Imidazolpuffer (pH 6,5)

	Phosphat	Imidazol
Aktivität	o,47 U/ml	o,43 U/ml

Der Vergleich zeigt, daß Phosphat keine Effektorrolle bei der Reaktion spielt.

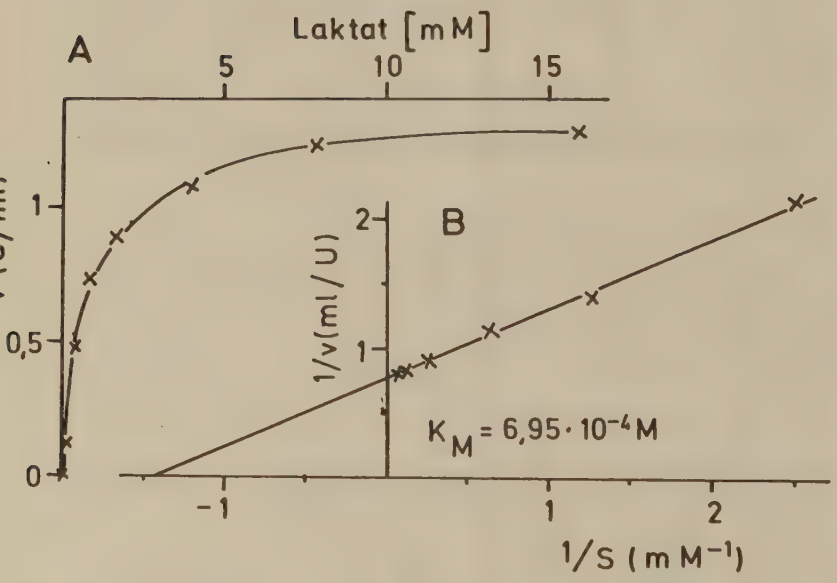

Abb.18:

A) Laktatsättigung der Laktatoxidase
B) Lineweaver-Burk-Darstellung der Beziehung zum Substrat

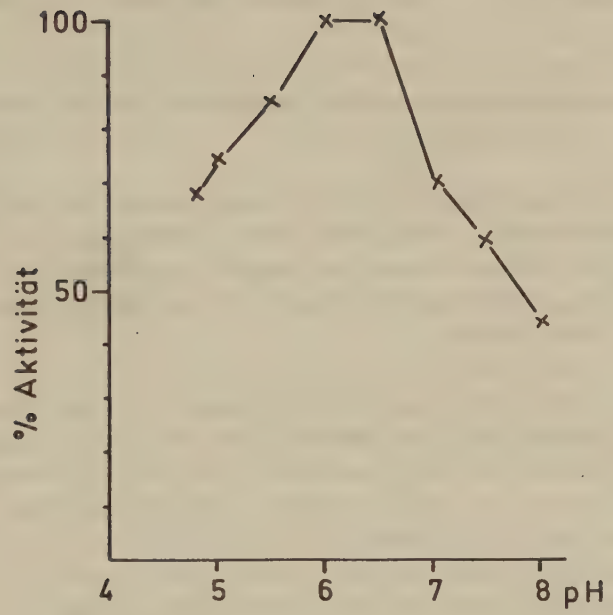

Abb.19:
pH-Optimum der Aktivität in Phosphatpuffer

3.4.3.7.2.5. Einfluß verschiedener Zusätze auf die Aktivität

ATP, ADP, AMP sowie Fructose-1,6-bisphosphat und Fructose-6-phosphat ($1o^{-2}$ M), die bei manchen Enzymen als Effektoren wirken, zeigten keinen Einfluß auf die Aktivität der Oxidase. L-Alanin ($1o^{-2}$ M) wird nicht umgesetzt. KCN ($1o^{-3}$ M) und Methylenblau ($1o^{-3}$ M) haben keinen Einfluß auf die O_2-Auf-

nahmerate (gemessen in Warburggefäßen entsprechend Versuch 3.4.3.7.2.1.1.). Methylenblau wird dabei nicht entfärbt.

3.4.3.7.2.6. Spektroskopische Untersuchungen zur Art der prosthetischen Gruppe

Bei den bisher bekannten H_2O_2-bildenden Oxidasen handelt es sich meistens um Flavoproteine. Z.B. enthalten die Glucoseoxidase und Xanthinoxidase als prosthetische Gruppe FAD, ebenso die D-Aminosäureoxidase, während die L-Aminosäureoxidase FMN enthält.

Die meisten Flavoenzyme haben ein typisches Absorptionsspektrum mit Maxima bei etwa 45o nm, was ihre gelbe Farbe bedingt, sowie bei etwa 38o nm, Typisch für diese Enzyme ist es auch, daß es bei Substratzusatz zum Verschwinden oder zu einer Intensitätsabnahme des 45o nm-Peaks kommt, und zwar infolge der Bildung eines Komplexes zwischen Enzym und Substrat, wobei die Flavingruppe des Enzyms teilweise - als Semiquinon - oder völlig reduziert vorliegen kann. Das Verschwinden der Absorptionsbande bei 45o nm ist z.B. bei der D-Aminosäureoxidase (Slater, 1966), Glucoseoxidase (Slater, 1966) und der FAD-haltigen Pyruvatoxidase von Lactobacillus delbrückii (Hager et al., 1954) beobachtet worden, Auch die Laktatoxidase von Mycobacterium phlei (Sutton, 1955), die FMN als prosthetische Gruppe enthält, und die flavinhaltigen NAD-unabhängigen D- und L-Laktatdehydrogenasen von L. casei (Mizushima, Kitahara, 1962) zeigen ein solchen Verhalten.

Wir vermuten, daß es sich bei der Laktatoxidase von L.curvatus ebenfalls um ein Flavoprotein handeln würde. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die Absorption des ange-

reicherten Enzyms über einen Bereich von 600-370 nm gemessen. Als Vergleich wurde auch das Absorptionsspektrum des Rohextraktes aufgenommen. Das angereicherte Enzym wurde zusätzlich nach Zugabe von L-Laktat unter anaeroben Bedingungen untersucht (vergl. Material und Methoden).

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, zeigt die angereicherte Laktatoxidase im oxidierten Zustand einen für Flavoproteine typischen Absorptionspeak bei etwa 448 nm, während das Rohextraktspektrum in diesem Bereich nur eine schwach angedeutete Schulter aufweist. Die Anreicherung der Oxidase ist also mit einer Intensivierung einer typischen Flavinbande verbunden. Bei Zusatz von Laktat kommt es zu einer deutlichen Abflachung dieses Absorptionspeaks, was für die Bildung eines Komplexes zwischen Laktat und Enzym spricht.

Diese Untersuchungen sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, daß es sich bei der Laktatoxidase um ein Flavoprotein handelt. Die Tatsache, daß die Absorptionsbande im Bereich von 450 nm nicht völlig verschwindet, beruht wohl darauf, daß die Oxidasefraktion nach 17-facher Anreicherung noch viele "fremde" Flavoproteine enthielt, die sich wahrscheinlich wie die Laktatoxidase etwas anreicherten und dadurch zu einer relativ starken Absorption in diesem Bereich führten. Diese Absorption verschwindet aber bei Laktatzusatz nicht, da Laktat nicht das Substrat dieser Enzyme ist.

Tatsächlich scheint L. curvatus - besonders nach aerober Anzucht - viele Flavoproteine zu enthalten. Jedenfalls waren fast alle bei der Enzymanreicherung anfallenden Fraktionen (auch die ohne Laktatoxidase) gelb gefärbt.

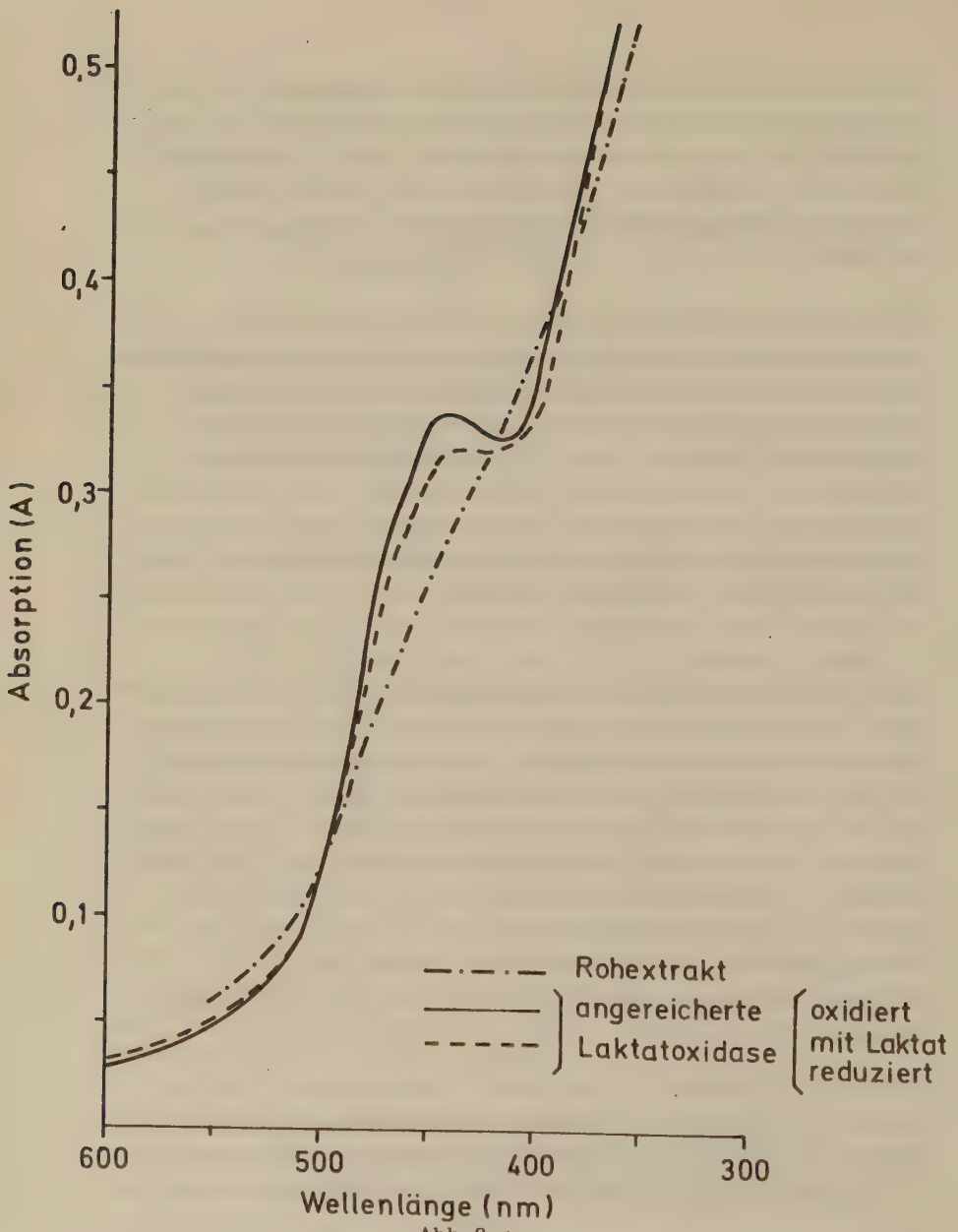

Abb.2o:

Absorptionsspektrum des Rohextraktes und der angereicherten Laktatoxidase; angereicherte Fraktion im oxidierten Zustand und nach Reduktion mit Laktat untersucht.

3.4.4. Untersuchungen zur Regulation des Laktatabbaus

3.4.4.1. Spezifische Aktivität der Laktatoxidase in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und der Begasung

L. curvatus wurde anaerob (unter N_2) bzw. aerob (unter Schütteln) auf MRS gezogen und bei unterschiedlichen Wachstumsphasen geerntet. Nach Aufschluß der Zellen wurde im dialysierten Rohextrakt die Aktivität der Laktatoxidase bestimmt.

Wie Abbildung 21 zeigt, wird unter anaeroben Bedingungen nur sehr wenig Oxidase gebildet, und die spezifische Aktivität bleibt während des Wachstums relativ konstant. Bei aerober Anzucht ist die spezifische Aktivität des Enzyms während der log-Phase zwar auch sehr niedrig, steigt jedoch mit zunehmendem Alter der Kultur sehr stark an, so daß in der späteren stationären Phase schließlich ein mehr als 10 mal so hoher Gehalt der Zellen an Laktatoxidase erreicht wird wie bei Wachstum unter N_2. Sauerstoff, ein Substrat der Laktatoxidase, wirkt also induzierend auf die Bildung des Enzyms. (Eine Aktivierung der Oxidase durch in den aeroben Zellen eventuell vorhandene Effektoren ist unwahrscheinlich, da die Extrakte dialysiert und in der Küvette stark verdünnt waren.) Der leichte Anstieg der spezifischen Aktivität in der log-Phase bei anaerobem Wachstum wird wahrscheinlich durch im Medium noch vorhandene Sauerstoffreste hervorgerufen, die im Laufe des Wachstums aufgebraucht werden, so daß später die Aktivität des Enzyms wieder absinkt.

Die Zunahme der spezifischen Aktivität der Laktatoxidase mit dem Alter der Kultur deutet darauf hin,

daß dieses Enzym erst in der stationären Phase für die Zellen an Bedeutung gewinnt. Der Versuch zeigt außerdem, daß L. curvatus aerob gezogen und in der spätstationären Phase geerntet werden sollte, wenn man eine möglichst hohe spezifische und Gesamtaktivität an Laktatoxidase erhalten will (vergl. Versuch 3.4.3.7.2.).

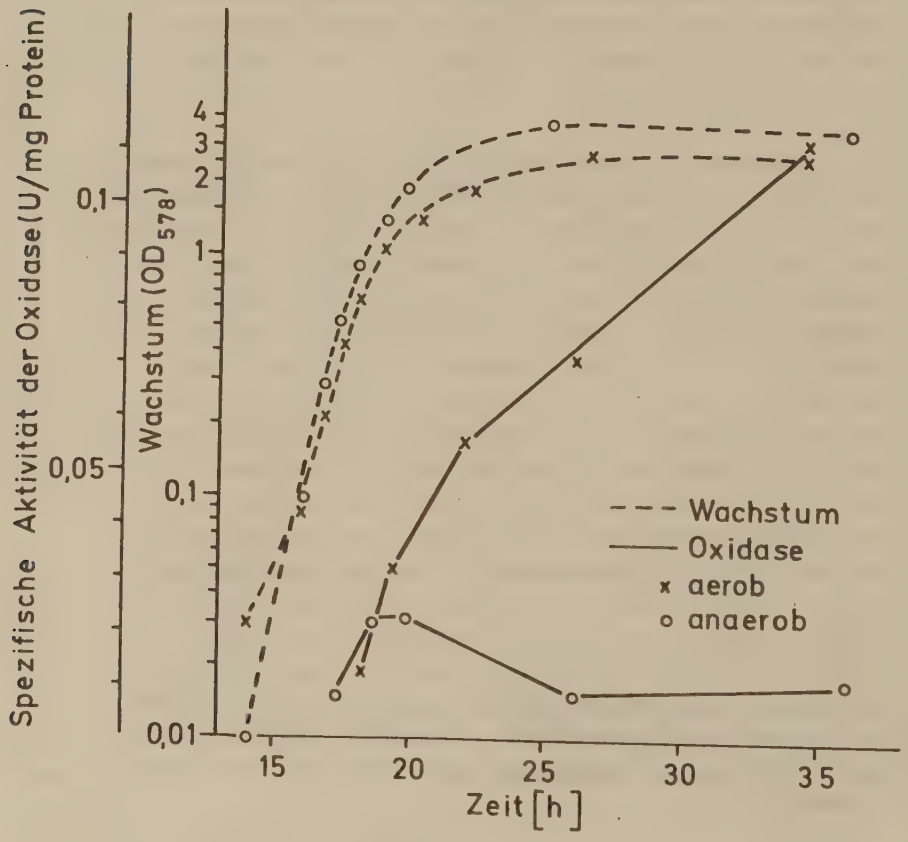

Abb.21:
Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Laktatoxidase vom Wachstum und der Gasphase.

3.4.4.2. O_2-Aufnahme in vivo: Abhängigkeit vom Alter der Kultur und der Gasphase

Wie aus Versuch 3.4.4.1. hervorgeht, ist die spezifische Aktivität der Lakatoxidase bei aerober Anzucht höher als bei anaerober und steigt außerdem mit dem Alter der Kultur an. Es sollte nun geprüft werden, ob sich diese Schwankungen im Enzymgehalt der Zellen in vivo widerspiegelten, d.h. ob mit dem Ansteigen der spezifischen Aktivität der Laktatoxidase auch ein Ansteigen der durch Laktat ausgelösten "Atmungsaktivität" der Zellen verbunden war.

3.4.4.2.1. Abhängigkeit des O_2-Verbrauchs von der Zellmenge

Als Maß für die laktatabbauende Aktivität der Zellen sollte die durch L-Laktatzusatz ausgelöste O_2-Aufnahmerate dienen. Zunächst mußte festgestellt werden, welcher Zusammenhang zwischen der O_2-Aufnahmegeschwindigkeit und der Menge eingesetzter Zellen gleicher spezifischer Laktatoxidaseaktivität besteht. Dazu wurden verschieden stark verdünnte Suspensionen von aerob gezogenen Zellen der stationären Phase in Warburggefäßen mit L-Laktat inkubiert und der O_2-Verbrauch verfolgt (genauere Angaben siehe Abb.22).

Wie zu erwarten, stieg die Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme mit zunehmender Zellmenge an. Allerdings war die Rate nur anfänglich konstant und nahm schon merklich ab, als erst ca. 3 µMol O_2 verbraucht worden waren. Ähnliches war auch bei Einsatz von zellfreiem Extrakt gefunden worden (Versuch 3.4.3.7.2.1.1.).

Wie der Abbildung 22 zu entnehmen ist, ist die O_2-Aufnahmerate (Anfangsgeschwindigkeit) der Zellmenge und damit auch der in den Zellen enthaltenen Oxidasemenge direkt proportional und kann daher als Maß für diese dienen.

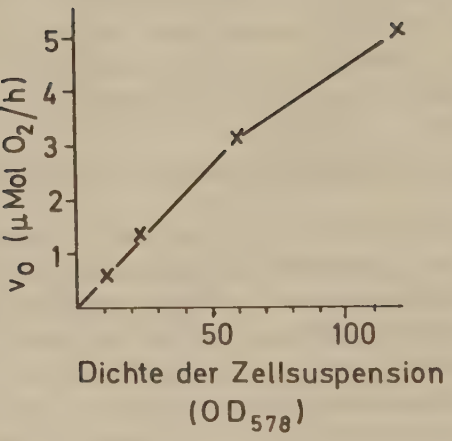

Abb.22:

Abhängigkeit der O_2-Aufnahmerate von der Menge eingesetzter Zellen.
Testbedingungen: 3o°C; Luftsauerstoff; Schüttelfrequenz 76 Ausschläge/min; Zellen in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; Substrat 2o µMol L-Laktat; Endvolumen 2,3 ml.
Aktivität vor Zukippen des Laktats praktisch gleich null.

3.4.4.2.2. O_2-Aufnahmerate aerob und anaerob gezogener Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen

L. curvatus wurde aerob (unter Schütteln) und anaerob (unter N_2) auf MRS gezogen und während der spätlogarithmischen bzw. stationären Phase geerntet. Jeweils gleiche Mengen dieser Zellen wurden mit L-Laktat inkubiert und die O_2-Aufnahme verfolgt. (Testbedingungen vergl. 3.4.4.2.1, aber konstante Zellmenge in den Gefäßen (OD_{578} der Suspension in den Gefäßen = 2o)).

Tab.18: "Atmungsaktivität" von Zellen bei verschiedenen Anzuchtbedingungen.
Raten während der linearen Anfangsphase gemessen.
Ohne Laktat erfolgten praktisch keine Druckänderungen.

Anzucht-bedingungen	Wachstumsdichte OD_{578}	O_2-Verbrauch μMol O_2/h
aerob	o,7	o,8
	2,7	1,7
anaerob	o,8	o,25
	3,7	o,3

Ein Vergleich der O_2-Aufnahmerate von Zellen aus der stationären Phase (Tab.18) zeigt, daß die O_2-Aufnahmeaktivität bei aerober Anzucht deutlich höher ist als bei anaerober. Während sie bei aerobem Wachstum mit dem Alter der Kultur ansteigt, bleibt sie bei anaerober Anzucht praktisch konstant. Es zeigen sich also deutliche Parallelen mit der Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Laktatoxidase von den Anzuchtbedingungen (Versuch 3.4.4.1.). Daraus läßt sich mit großer

Wahrscheinlichkeit schließen, daß die Laktatoxidase an der laktatabhängigen O_2-Aufnahme der Zellen beteiligt ist.

Die aerob gezogenen Zellen der logarithmischen Phase zeigen jedoch im Vergleich zu den anaeroben eine relativ hohe Oxidationsrate, was nach Versuch 3.4.4.1. nicht zu erwarten war, da die spezifische Aktivität der Laktatoxidase in der log-Phase sowohl nach anaerober wie nach aerober Anzucht sehr niedrig und etwa gleich war. Das könnte bedeuten, daß die Laktatoxidase in den Zellen einer Regulation unterliegt. Es kann sich hier aber auch um eine Überlagerung mit anderen Zellaktivitäten - z.B. der Laktataufnahme - handeln, welche die Aktivität der Oxidase in den Zellen beeinflussen. Auch wäre denkbar, daß bei aerobem Wachstum während der log-Phase Laktat noch über einen anderen Stoffwechselweg unter O_2-Verbrauch abgebaut werden kann (vielleicht unter Beteiligung der NADH-Oxidase).

3.5. Vergleichende Untersuchungen zur Laktatoxidation bei Gruppe I und II

3.5.1. Nachweis von Laktatoxidasen bzw. NAD-unabhängigen Laktatdehydrogenasen

Nachdem bei L. curvatus, einem Vertreter der Gruppe I, gezeigt worden war, daß dieser Stamm Laktat über eine H_2O_2-bildende Laktatoxidase abbaut, stellte sich die Frage, ob auch bei anderen Stämmen ein solches Enzym vorhanden ist, das für den Abbau des Laktats verantwortlich gemacht werden könnte. Es wurde daher aus einigen Stämmen (nach aerober Anzucht und Ernte in der stationären Phase) ein Rohextrakt hergestellt und nach Dialyse mit Hilfe des optischen Tests auf Laktatoxidase-Aktivität hin geprüft.

Da bekannt war, daß neben Vertretern anderer Gattungen auch einige Laktobazillen NAD-unabhängige, oft D-spezifische Laktatdehydrogenasen besitzen (Snoswell, 1963; Mizushima, Kitahara, 1962; Kaufmann, Dikstein, 1961; Garvie, 1969), welche die Elektronen des Laktats auf Redoxfarbstoffe wie DCIP übertragen können, wurden die Extrakte auch auf diese Aktivität hin untersucht.

Tab.19: Nachweis von Laktatoxidasen bzw. NAD-unabhängigen Laktatdehydrogenasen

Stamm	Gruppe	getestetes Isomer	10^2 x spez.Aktiv.bei:	
			Oxidasetest (H_2O_2-Bildung)	DCIP-Reduktion
L.curvatus 2oolo	I	L	5	o,6
		D	o,1	o,15
L.sake 2oo17	I	L	24	14
		D	o,16	o,1
L.coryniformis 2ooo1	II	L	o,o	o,4
		D	o,6	72
L.plantarum 2o174	II	L	o,1	o,5
		D	o,1	24
L.casei 2oo11	II	L	o,1	o,2
		D	o,1	1,4

Wie die Tabelle 19 zeigt, war eine H_2O_2-bildende Laktatoxidase in signifikanten Mengen neben L. curvatus nur bei L. sake nachweisbar, der wie L. curvatus zu Gruppe I zählt, und zwar handelt es sich wie bei L. curvatus um ein L-spezi-

fisches Enzym. Bei den zur Gruppe II zählenden Stämmen war weder mit L- noch mit D-Laktat deutliche H_2O_2-Bildung nachweisbar. Diese Stämme besitzen offenbar keine Laktatoxidasen vom Typ des bei L. curvatus gefundenen Enzyms, das zwei Elektronen auf O_2 transferiert.

Mit DCIP als Elektronenakzeptor zeigte nur L. sake einen deutlichen L-Laktatumsatz, während alle anderen Stämme L-Laktat nicht in signifikantem Maße angriffen. Bei Einsatz von D-Laktat zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den zu Gruppe I bzw. II zählenden Stämmen: Während L. curvatus und L. sake (I) D-Laktat praktisch nicht angreifen, kam es bei L. coryniformis, L. plantarum und in geringen Mengen auch bei L. casei mit D-Laktat zu rascher DCIP-Entfärbung. Diese Stämme besitzen offenbar NAD-unabhängige, D-spezifische Laktatdehydrogenasen. Da die hier untersuchten Stämme der Gruppe II alle eine NAD-abhängige D-Laktatdehydrogenase besitzen, könnte man vermuten, daß die Reduktion des DCIP durch Zusammenwirken der NAD-abhängigen LDH und einer eventuell vorhandenen Diaphorase herrührt:

$$\text{D-Laktat} + \text{NAD} \xrightarrow[\text{LDH}]{\text{NAD-abh.}} \text{Pyruvat} + \text{NADH}$$

$$\text{NADH} + \text{DCIP}_{ox.} \xrightarrow{\text{Diaphorase}} \text{NAD} + \text{DCIP}_{red.}$$

$$\text{D-Laktat} + \text{DCIP}_{ox.} \longrightarrow \text{Pyruvat} + \text{DCIP}_{red.}$$

Diese Annahme ist jedoch sehr unwahrscheinlich, weil hier dialysierte Rohextrakte eingesetzt wurden, die weitgehend NAD-frei sein sollten, und diese Rohextrakte in der Küvette noch dazu sehr stark verdünnt wurden.

Außerdem konnte bei L. coryniformis (Versuch 3.6.5. bzw. 3.6.3.) durch Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH bzw. durch Abtrennen dieses Enzyms von der NAD-unabhängigen LDH ein Mitwirken des NAD-abhängigen Enzyms an der DCIP-Reduktion ausgeschlossen werden.

3.5.2. Einfluß von Katalase auf den Laktatumsatz bei den Gruppen I und II

Wie aus den obigen Tests hervorgeht, können die untersuchten Vertreter der Gruppe II D-Laktat ohne die Mitwirkung von NAD oxidativ angreifen. Daß die Tests auf H_2O_2-Bildung, bei denen O_2 als Elektronenakzeptor fungieren müßte, negativ ausfielen, kann einmal bedeuten, daß eine Reduktion von O_2 überhaupt nicht möglich ist, oder daß diese Reduktion nicht mit der Bildung von H_2O_2 verbunden ist.

Um das zu klären, wurde anhand dialysierter Rohextrakte von L. coryniformis und L. plantarum untersucht, ob D-Laktat unter O_2-Verbrauch angegriffen und CO_2 gebildet wird. In Parallelansätzen wurde (entsprechend Versuch 3.4.3.2.) Katalase zugesetzt. Zum Vergleich wurde auch ein Rohextrakt von L. sake, der sich den obigen Tests nach zu schließen wie L. curvatus verhalten sollte, auf L-Laktatoxidation mit und ohne Katalase untersucht.

Wie Tabelle 2o zeigt, kam es bei allen Stämmen nach Laktatzusatz zu O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung, jedoch mit sehr unterschiedlichen Geschwindigkeiten: Während der Rohextrakt von L. sake das Substrat in ca. 1 h umsetzte, erfolgte der Umsatz bei L. coryniformis und L. plantarum so langsam, daß auch nach 7 h der O_2-Verbrauch und die CO_2-Bildung noch nicht beendet waren.

Während bei L. sake der Umsatz durch Katalase in gleicher Weise beeinflußt wird wie bei L. curvatus (Absinken des O_2-Verbrauchs auf die Hälfte; fast keine CO_2-Bildung) und man daher annehmen muß, daß dieser Stamm Laktat wie L. curvatus über eine H_2O_2-bildende Laktatoxidase angreift, hat der Zusatz von Katalase auf den Gasaustausch durch L. coryniformis und L. plantarum praktisch keinen Einfluß. Es kommt also bei diesen Stämmen zwar zu einer Reduktion von O_2 durch Laktat, offenbar jedoch ohne Bildung von freiem H_2O_2.

Tab.2o: Laktatumsatz in vitro mit und ohne Katalase. Angaben in µMol; 25°C; dialysierte Rohextrakte in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; L. sake 8 mg, L.plantarum 18 mg, L. coryniformis 44 mg Protein; Substrat 5 µMol Laktat (L bzw. D); Katalase 4oo µg; Endvolumen 2,2 ml.
CO_2-Retention durch α' berücksichtigt.
Keine Druckänderungen vor Substratzusatz (1 h lang verfolgt).

Stamm	Gruppe	eingesetztes Isomer	- Katalase		+ Katalase	
			O_2-Verbrauch	CO_2-Bildg.	O_2-Verbrauch	CO_2-Bildg.
L.sake 2oo17	I	L	4,4	5,o	2,3	o,8
L.coryniformis 2ooo1	II	D	6,4	4,9	6,2	4,7
L.plantarum 2o174	II	D	5,o	4,3	4,9	3,8

3.5.3. Sättigung der Laktatoxidation mit Sauerstoff

Die langsame O_2-Aufnahme ließ uns vermuten, daß die Sauerstoff-verbrauchenden Enzyme von L. coryniformis und L. plantarum eine geringere Affinität zu Sauerstoff haben, als die von L. sake und wohl auch von L. curvatus. Solche Affinitätsunterschiede sollten sich dadurch äußern, daß der Oxidationsvorgang bei L. sake und L. curvatus durch geringere O_2-Konzentrationen gesättigt sein sollte als bei L. coryniformis und L. plantarum.

Zur Prüfung dieser Vermutung wurde die Laktatoxidation durch Rohextrakte in Warburggefäßen untersucht, die mit verschiedenen O_2/N_2-Gemischen gefüllt waren. Bei L. curvatus und L. sake wurden 2o µMol L-Laktat, bei L. coryniformis und L. plantarum 4o µMol D-Laktat pro Gefäß eingesetzt.(In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß diese Konzentrationen bei den einzelnen Organismen im Sättigungsbereich lagen.)

Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 23 A dargestellt. Der besseren Übersicht wegen wurden die während der linearen Anfangsphasen gemessenen O_2-Aufnahmeraten nicht in absoluten Größen (µMol/h) sondern in % der maximal erreichten Geschwindigkeit ausgedrückt ("v"). Die Absolutgeschwindigkeiten waren (bei loo % O_2) bei L. sake 2,2; bei L. curvatus 1,2; bei L. coryniformis o,8 und bei L. plantarum o,55 µMol/h. Bei L. sake ließ sich die O_2-Aufnahmegeschwindigkeit weder bei 5, bei 2o noch bei loo % O_2 durch Erhöhen der Schüttelfrequenz der Warburggefäße (von 76 auf 22o Ausschläge/min) steigern. Die Lösungsgeschwindigkeit des Sauerstoffs in der Flüssigkeit ist also für den O_2-Verbrauch nicht begrenzend.

Das muß auch für die Extrakte der anderen hier untersuchten Organismen zutreffen, da diese O_2 in geringeren Raten als L. sake verbrauchten.

Während die O_2-verbrauchenden Enzyme von L. curvatus und L. sake unter Luftsauerstoff (2o %) schon fast gesättigt sind, kommt es bei L. plantarum und L. coryniformis bei Erhöhen der O_2-Konzentration über 2o % hinaus noch zu einer erheblichen Steigerung der Geschwindigkeit. Eine Sättigung wird selbst bei Einsatz von reinem Sauerstoff nicht erreicht. Abbildung 23 B zeigt die Darstellung nach Lineweaver-Burk, aus der sich ungefähre Werte für den $K_M^{O_2}$ angeben lassen. Danach sind die Enzyme von L. curvatus bei ca. 3,6 %, von L. sake bei 4,3 %, von L. plantarum bei 63 % und von L. coryniformis bei 125 % O_2 halbgesättigt. Ausgehend von einem Löslichkeitskoeffizienten für O_2 von ca. o,o28 (Bunsenscher Absorptionskoeffizient bei 25°C) ergeben sich für die O_2-Konzentration bei Halbsättigung in der Lösung folgende Werte:

L. curvatus	o,o49 mM
L. sake	o,o58 mM
L. plantarum	o,86 mM
L. coryniformis	1,71 mM

(Berechnung nach der Gleichung: $c_{Fl.} = \alpha_{Bu} \cdot \frac{T}{273} \cdot c_{Gas}$

c_{Gas} = Konzentration von O_2 im Gasraum = $\frac{\%\ O_2}{22,4 \cdot 1oo}$ bei 1 atm;

$c_{Fl.}$ = Konzentration von O_2 in der Flüssigkeit;

α_{Bu} = Bunsenscher Absorptionskoeffizient; vergl. Näser: Physikalische Chemie.)

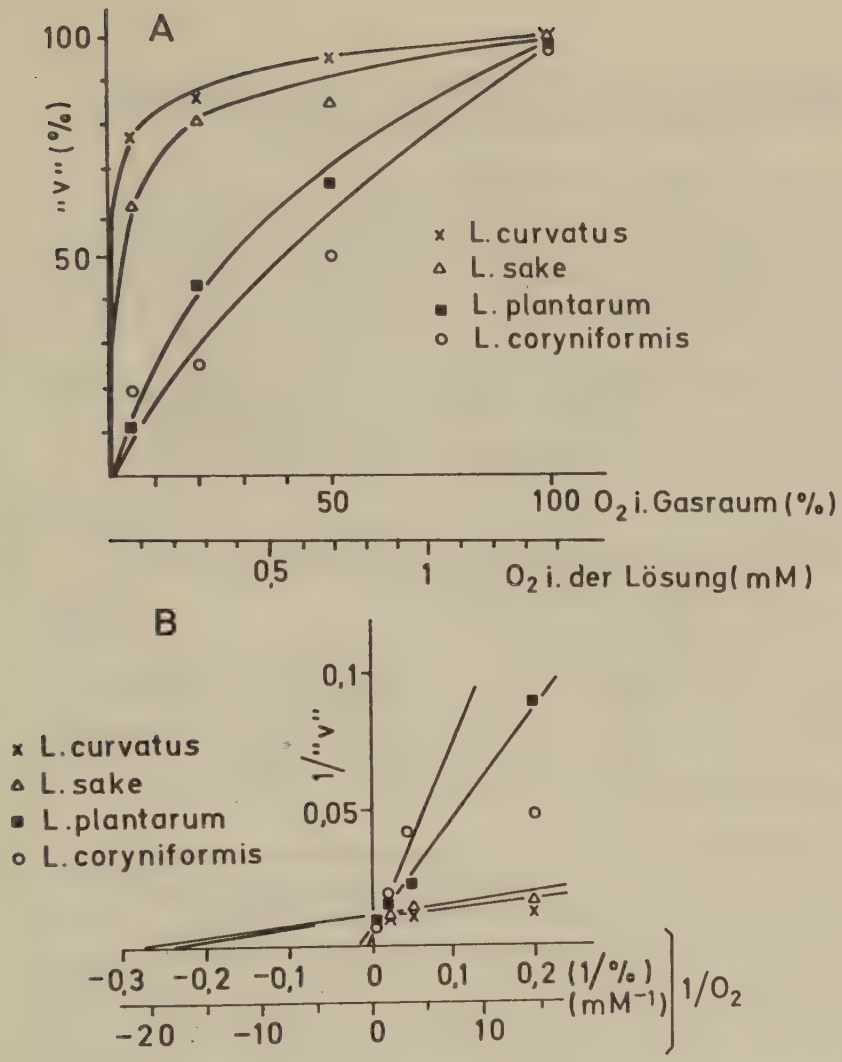

Abb.23:

O_2-Sättigung der Laktatoxidation im Rohextrakt
A) Normaldarstellung
B) Lineweaver-Burk-Darstellung

Dialysierter Rohextrakt in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; L.curvatus, L. sake: 2o µMol L-Laktat; L.plantarum, L. coryniformis 4o µMol D-Laktat; 25°C, Schüttelfrequenz 76 Ausschläge/min; Endvolumen 2 ml; Protein/Gefäß: L.curvatus 1 mg, L.sake o,7 mg, L.coryniformis 5 mg, L.plantarum 13 mg. "v": vergl. Text.

3.6. Untersuchung der Laktatoxidation bei L.coryniformis

3.6.1. Löslichkeit der NAD-unabhängigen D-LDH

Zur Untersuchung, ob die NAD-unabhängige D-LDH von L. coryniformis löslich oder membrangebunden vorliegt, wurden nach Zellaufschluß noch unversehrte Zellen 2o min lang bei 8oo g abzentrifugiert und ein Aliquot des so erhaltenen membranhaltigen Homogenats nochmals bei 48.ooo g (1 h) zentrifugiert. Der membranfreie Rohextrakt sowie das Homogenat wurden nach Dialyse auf Aktivität der NAD-unabhängigen D-LDH getestet: Das Homogenat enthielt 3,9, der membranfreie Rohextrakt 4,2 U/ml. Das Enzym ist also vollständig löslich.

3.6.2. Sauerstoffaufnahme durch den zellfreien Extrakt: Abhängigkeit vom Membrananteil

Zum Vergleich wurde auch die D-Laktat-abhängige O_2-Aufnahme durch das Homogenat und den membranfreien Extrakt bestimmt (gleiche Präparation wie unter 3.6.1.) (Luftsauerstoff; 1 ml membranfreier Rohextrakt bzw. Homogenat; sonstige Bedingungen wie Versuch 3.5.3.)

Die O_2-Verbrauchsrate betrug in beiden Fällen o,4 µMol/h. Obwohl hier unterhalb der O_2-Sättigung gearbeitet wurde (Versuch 3.5.3.), kann man aus dem Ergebnis wohl schließen, daß auch die sauerstoffverbrauchende Aktivität nicht membrangebunden ist. Denn auch in Bereichen unterhalb der O_2-Sättigung hätte eine durch Entfernen der Membranen bedingte Abnahme der Aktivität mit einer Abnahme der O_2-Aufnahmerate verbunden sein müssen.

3.6.3. Elektrophoretisches Verhalten der Laktatdehydrogenasen von L. coryniformis

Nach diskelektrophoretischer Auftrennung ließen sich im Rohextrakt von L. coryniformis mit verschiedenen Entwicklerlösungen folgende Aktivitätsbanden nachweisen (Wanderungsstrecke bezogen auf die L-LDH aus Kaninchenherz (Iso-I) (Tab.21).

Tab.21: Diskelektrophoretische Auftrennung der Laktatdehydrogenasen von L. coryniformis.
PMS = Phenazinmethosulfat
NBT = Nitroblautetrazolium
DCIP = 2,6-Dichlorphenolindophenol

Substrat	Farbreagenz	$R_{Kaninchen}$	Art des Enzyms
D-Laktat + NAD	PMS/NBT	o,5 1,1	NAD-abh. D-LDH NAD-unabh. D-LDH
D-Laktat kein NAD	PMS/NBT	1,1	NAD-unabh. D-LDH
D-Laktat kein NAD	DCIP	1,1	NAD-unabh. D-LDH
L-Laktat kein NAD	PMS/NBT	keine Bande	-
L-Laktat + NAD	PMS/NBT	keine Bande	-
Pyruvat + NADH	PMS/NBT	o,5	NAD-abh. D-LDH

Aus dem Vergleich der verschiedenen Nachweisarten ergibt sich, daß L. coryniformis eine NAD-abhängige und eine NAD-unabhängige D-LDH besitzt, wogegen mit L-Laktat keine Aktivität nachweisbar ist. Wie in Versuch 3.5.1. schon vermutet, bestätigte sich hier durch die Trennung von NAD-abhängiger und NAD-unabhängiger D-LDH, daß die Elektronenübertragung von D-Laktat auf DCIP nicht an das Vorhandensein der NAD-abhängigen LDH (und einer Diaphorase) gebunden ist.

3.6.4. Produkt der Laktatoxidation mit DCIP als Elektronenakzeptor

In einem Testansatz, der 4o µMol D-Laktat, o,83 µMol DCIP und o,1 ml dialysierten Rohextrakt (Endvolumen 2 ml) in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 enthielt, wurden nach vollständigem Umsatz des DCIP o,74 µMol Pyruvat gefunden (9o %). Das D-Laktat wird also nach der Gleichung:

$$\text{Laktat} + \text{DCIP}_{ox.} \longrightarrow \text{Pyruvat} + \text{DCIP}_{red.}$$

zu Pyruvat umgesetzt.

3.6.5. Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH durch Hitze

Die NAD-abhängige und die NAD-unabhängige D-LDH wurden durch zweiminütiges Erhitzen auf 6o°C vollständig inaktiviert. Bei Zusatz von D-Laktat ließ sich die NAD-unabhängige D-LDH jedoch im Gegensatz zur NAD-abhängigen stabilisieren. Bei Zusatz von o,1 M D-Laktat waren nach 5 min Erhitzen auf 6o°C noch 98 % der Aktivität der NAD-unabhängigen LDH erhalten, während die Aktivität des NAD-abhängigen Enzyms auf null sank.

3.6.6. Gasaustausch und Pyruvatbildung mit und ohne Methylenblau nach Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH

Zur Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH wurde ein Rohextrakt aus L. coryniformis (aerobe Anzucht; stationäre Phase) nach Zusatz von o,1 M D-Laktat 5 min lang im Wasserbad auf 6o°C erhitzt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Um den Überstand einzuengen, wurde eine Ammonsulfatfällung von O-6o % Sättigung durchgeführt (in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5) und das präzipitierte Protein anschließend in Phosphatpuffer aufgenommen und dialysiert (gegen o,ol M Phosphatpuffer pH 6,5). Die Aktivität der NAD-abhängigen LDH sank dabei von 7 U/ml praktisch auf null, während die NAD-unabhängige LDH zu 8o % erhalten blieb.

Das Ergebnis einer Inkubation dieser Fraktion mit D-Laktat mit bzw. ohne Zusatz von Methylenblau zeigt Tabelle 22.

Tab.22: Umsatz von D-Laktat nach Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH.
Angaben in µMol; pro Gefäß 2 ml der Präparation entsprechend 24 U NAD-unabhängige D-LDH (spez.Akt. o,52) in o,1 M Phosphatpuffer pH 6,5; Substrat 51 µMol D-Laktat; Methylenblau 1 mg/ml; Endvolumen 2,3 ml; Temperatur 3o°C; Inkubationsdauer 7 h. Werte mit den entsprechenden an Kontrollen ohne Laktatzusatz gefundenen korrigiert.

Bedingung	O_2-Verbrauch	CO_2-Bildung	Pyruvat
+ Methylenblau	15,3	1o,o	6,3
- Methylenblau	6,2	4,7	o,4

Es kommt also auch nach Inaktivierung der NAD-abhängigen LDH zu O_2-Aufnahme und CO_2-Bildung aus Laktat. In Gegenwart von Methylenblau steigt die O_2-Aufnahme- und CO_2-Bildungsgeschwindigkeit. Die CO_2-Bildung wird jedoch nicht so stark gefördert wie die O_2-Aufnahme. Man findet daher im Gegensatz zum Ansatz ohne Methylenblau beträchtliche Mengen Pyruvat.

3.6.7. Spezifische Aktivität der NAD-unabhängigen D-LDH von L. coryniformis in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Begasung

L. coryniformis wurde nach anaerober (unter N_2) bzw. aerober (Schüttelkultur) Anzucht (auf MRS ohne Azetat und Citrat) bei verschiedenen Wachstumsphasen geerntet. Nach Zellaufschluß wurde die spezifische Aktivität der NAD-unabhängigen D-LDH in den dialysierten Rohextrakten bestimmt.

Aus Abbildung 24 geht hervor, daß die spezifische Aktivität des Enzyms beim Übergang in die stationäre Phase ansteigt, wobei bei aerober Anzucht bei gleichen Zelldichten ein etwa 2,5 mal so hoher Enzymgehalt erreicht wird wie unter anaeroben Bedingungen. In der späten stationären Phase sinkt die spezifische Aktivität dagegen fast auf null ab. Die Synthese des Enzyms hängt also vom Alter der Kultur ab, und wird durch Sauerstoff stimuliert, scheint also durch ähnliche Faktoren reguliert zu werden wie die Bildung der L-Laktatoxidase von L. curvatus (Versuch 3.4.4.1.)

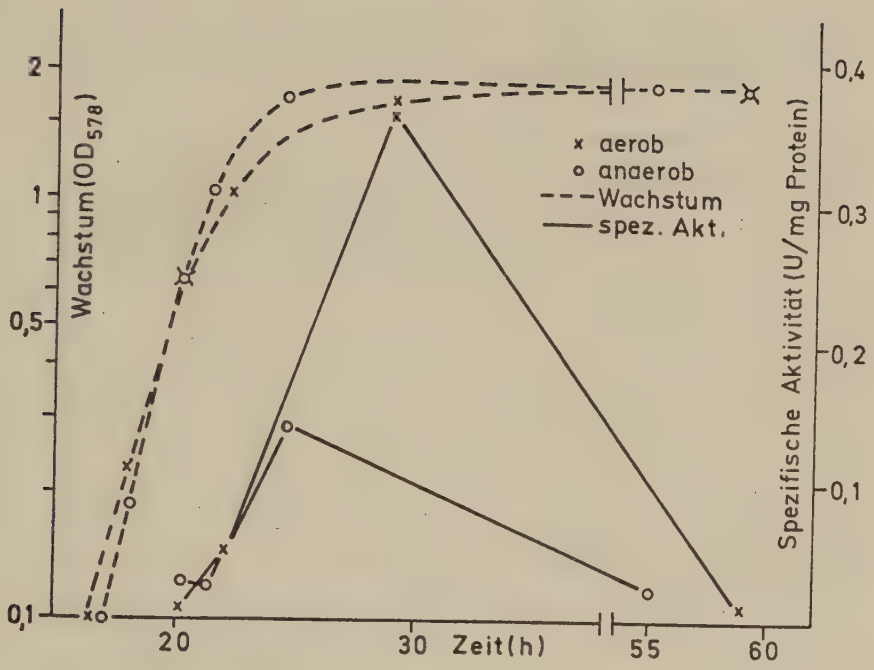

Abb.24:

Spezifische Aktivität der NAD-unabhängigen D-LDH in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Begasung

3.7. Einfluß von Sauerstoff auf das Wachstum bei Laktobazillen

3.7.1. Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit

Es wurde die Verdopplungszeit bei anaerobem (unter N_2) bzw. aerobem Wachstum (Schüttelkultur) bestimmt.

Tab.23: Einfluß von Sauerstoff auf die Verdopplungszeit.

Stamm	Medium	Verdopplungszeit (min)	
		anaerob	aerob
L.curvatus 2oolo	MRS	36	45
L.coryniformis 2oool	MRS-Azetat -Citrat	63	81
L.casei pseudoplantarum 2ooo8	MRS-Azetat -Citrat	84	96

Wie aus Tabelle 23 ersichtlich, senkt Sauerstoff die Wachstumsgeschwindigkeit.

3.7.2. Einfluß auf den molaren ökonomischen Koeffizienten ($Y_{Substrat}$)

Tabelle 24 zeigt die molare Zellausbeute (g Trockengewicht/Mol eingesetzter Glucose) von L. coryniformis und L. casei pseudoplantarum 2ooo8 nach aerobem und anaerobem Wachstum auf MRS ohne Azetat und Citrat.(Nach Korrektur mit dem für

Glucose-freies Medium erhaltenen Wert war die Zellausbeute bis etwa o,6 % Glucose dem Glucosegehalt des Mediums direkt proportional.) Sauerstoff hat also auch auf den Zellertrag eher einen hemmenden Einfluß.
$Y_{Substrat}$ wurde bei L. curvatus nicht bestimmt, doch ergab sich in mehreren Wachstumsversuchen, daß aerob geringere Zelldichten (OD_{578}) erreicht werden als anaerob (Versuch 3.4.4.1. und 3.7.4.).

Tab.24: Molarer ökonomischer Koeffizient nach aerobem und anaerobem Wachstum.
Angaben in g Trockengewicht/Mol Glucose.

Stamm	$Y_{Glucose}$ anaerob	aerob
L.coryniformis 2oool	21,5	19,7
L.casei pseudoplantarum 2ooo8	27,3	24,7

3.7.3. Wachstum auf Laktat

Um festzustellen, ob der eine oder andere Stamm auf Laktat wachsen könne, wurde das Wachstum auf Glucose-freier MRS (ohne Azetat und Citrat) mit bzw. ohne Zusatz von 1 % DL-Laktat als C-Quelle untersucht, und zwar jeweils anaerob und aerob.

Von den hier untersuchten Stämmen (L. plantarum 2o174, L. casei 2ooll, L. casei pseudoplantarum 2ooo8, L.curvatus 2oolo, L. sake 2ool7, L. xylosus 2o175 und L. coryniformis 2oool) war nur bei L.plantarum eine signifikante Steigerung des Wachstums durch Laktat verglichen mit dem Medium ohne zugesetzte C-Quelle meßbar, und zwar unter aeroben Bedingungen, nicht dagegen unter anaeroben (Abb.25). Alle anderen Stämme wuchsen zwar auf dem Grundmedium bis zu Dichten von durchschnittlich o,o7 (OD_{578}). Der Zusatz von Laktat erbrachte jedoch keine Steigerung (Messung über drei Tage).

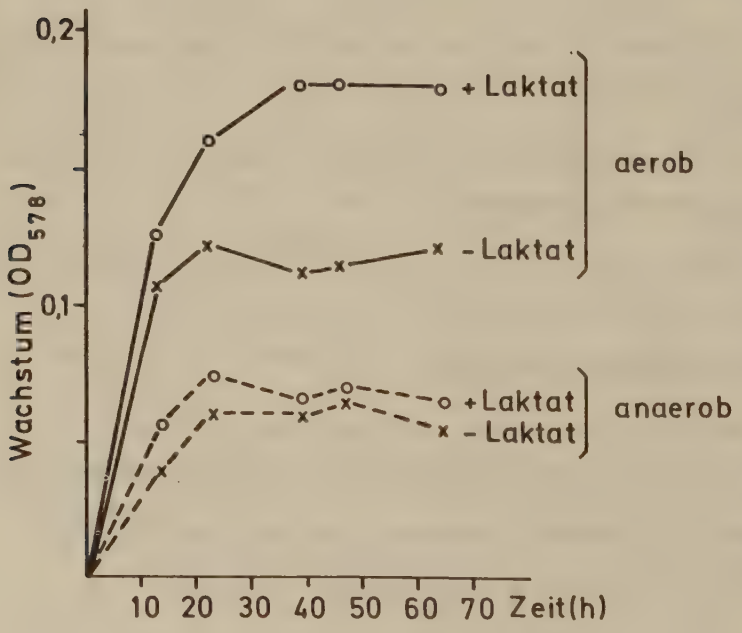

Abb.25:
Wachstum von L.plantarum 2o174 auf Laktat

3.7.4. Laktat- und Azetatbildung durch 1. curvatus bei anaerobem bzw. aerobem Wachstum auf MRS ohne Azetat und Citrat

Um eine eventuelle Azetatbildung während des Wachstums nachweisen zu können, wurde L. curvatus auf MRS ohne Azetat- und Citratzusatz gezogen. (Citrat wurde weggelassen, da es unter Umständen zu Azetat abgebaut werden kann.) Im Vergleich zu normaler MRS wuchs L. curvatus auf diesem Medium etwas langsamer (Verdopplungszeit bei anaerobem Wachstum auf MRS ohne Azetat und Citrat 45 min, auf MRS 36 min) und erreichte in der stationären Phase auch nicht ganz so hohe Dichten . Um ein zu starkes Ansäuern des Mediums zu verhindern, wurden nur o,5 % Glucose zugesetzt.

Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, daß bei aerobem Wachstum das aus Glucose gebildete Laktat (L und D) in der stationären Phase teilweise wieder verbraucht wird, während bei anaerobem Wachstum die L-Laktatkonzentration nur sehr wenig und die D-Laktatkonzentration gar nicht abnimmt. (Zu einer stärkeren Razemisierung kommt es wohl deshalb nicht, weil die Zellen schon kurz nach Erreichen der zur Induktion nötigen L-Laktatkonzentration in die stationäre Phase übergehen, in der die Aktivität der Razemase schon wieder stark abnimmt (Stetter, 1973).)

Bei aerober Anzucht kommt es im Gegensatz zur anaeroben zu einem leichten Anstieg der Azetatkonzentration. Dieser ist jedoch weit geringer, als der Abnahme an Laktat entspricht. Auch die geringen ausgeschiedenen Mengen Pyruvat entsprechen nicht dem Laktatverbrauch. (Pyruvatbildung in Abb. 26 nicht angegeben; anaerob: Anstieg zwischen logarithmischer und stationärer Phase von o,2 auf o,5, aerob von o,2 auf o,9 µMol/ml.)

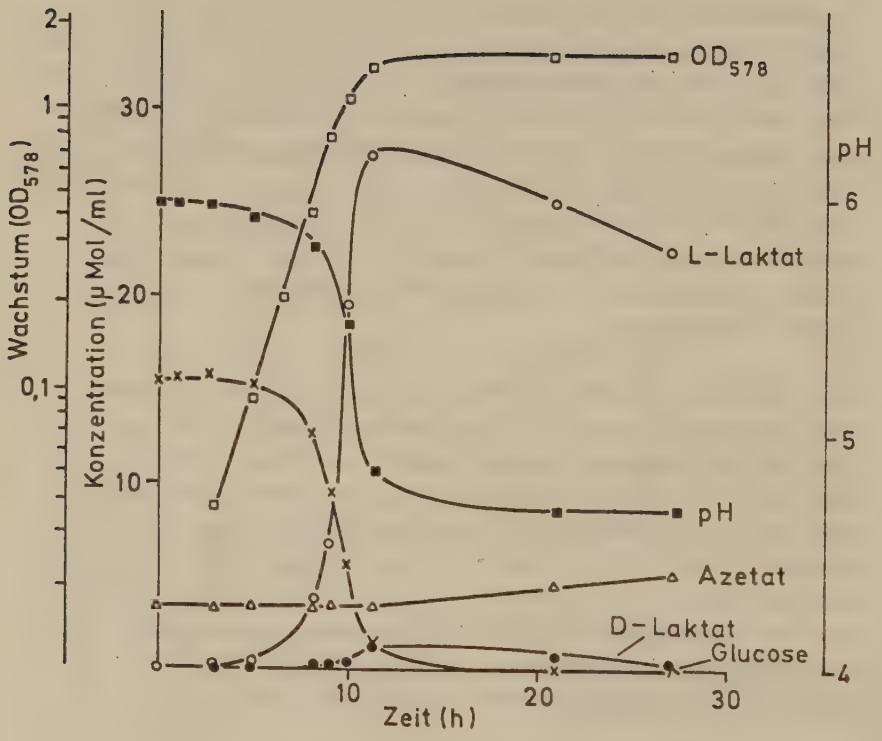

Abb.26 A:

Aerobes Wachstum von L. curvatus auf MRS ohne Azetat und Citrat mit o,5 % Glucose

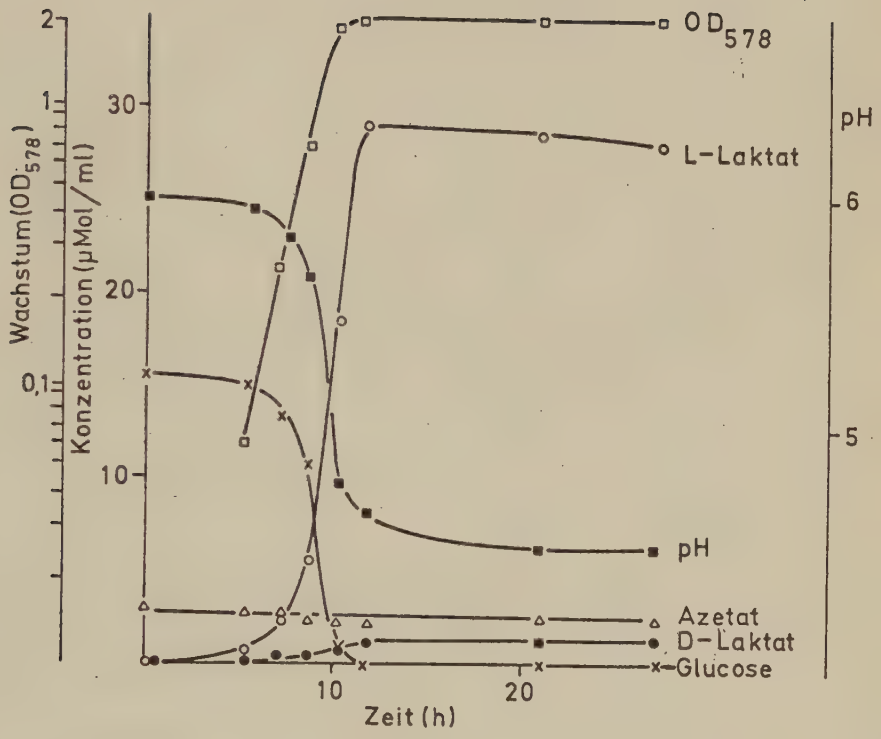

Abb.26 B:

Anaerobes Wachstum von L. curvatus auf MRS ohne Azetat und Citrat mit o,5 % Glucose

Offenbar wird in Kulturmedium unter aeroben Bedingungen noch etwas anderes als Azetat und Pyruvat aus Laktat gebildet. Wachstum auf Kosten des verbrauchten Laktats ist offenbar nicht möglich, obwohl der pH noch weiteres Wachstum zugelassen hätte.

4. Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Fähigkeit zum oxidativen Laktatabbau unter Laktobazillen sehr verbreitet ist, obwohl diese Laktat im allgemeinen als Endprodukt ausscheiden. Bei 21 von 23 untersuchten Strepto- und Thermobakterien bewirkte Laktat eine Steigerung der O_2-Aufnahme (µMol O_2/h).

Die Organismen verhielten sich bei der "Laktatveratmung" jedoch nicht einheitlich. Es zeigten sich vielmehr quantitative und qualitative Unterschiede, besonders in Bezug auf den Einfluß des autoxidablen Redoxfarbstoffes Methylenblau.

Im folgenden soll die O_2-Aufnahme in % der Gärungsrate ausgedrückt werden, d.h. der Laktatbildung aus Glucose, wie sie in Suspensionen ruhender Zellen in Puffer erfolgt. Diese Gärungsrate beträgt bei Laktobazillen, bezogen auf die in unseren O_2-Aufnahmeversuchen eingesetzte Zellmasse, durchschnittlich 2oo µMol Laktat/h.

Die Organismen ließen sich in zwei Gruppen einteilen:

Gruppe I:
Die Vertreter von Gruppe I (L. curvatus, L. sake, L. lactis, L. acidophilus, L. bulgaricus) können die Elektronen des Laktats direkt auf O_2 übertragen, brauchen also dazu kein Methylenblau. Dementsprechend hat die Zugabe dieses Farbstoffs praktisch keinen Einfluß auf den O_2-Verbrauch. Die O_2-Aufnahmeraten entsprechen etwa 8 % der Gärungsrate. Einige Arten (L. bulgaricus, L. acidophilus) sind jedoch weniger aktiv und erreichen nur ca. 2 %, L. acidophilus 2oo79 sogar nur o,5 % der Gärungsrate in Glucose.

Gruppe II:
Die zu Gruppe II zusammengefaßten Organismen können die Elektronen des Laktats nur sehr schlecht oder gar nicht unmittelbar auf O_2 übertragen, sondern bedürfen dazu der Vermittlung von Methylenblau. Während die O_2-Aufnahme ohne Zusatz dieses Farbstoffes nur etwa o,5 % der Gärungsrate entspricht, werden in Gegenwart von Methylenblau Raten von ca. 3 % erreicht. Hierher gehören L. plantarum, L. casei, L. coryniformis und L. xylosus.

Laktatabbau unter O_2-Verbrauch wurde bereits 1947 von Douglas bei L. brevis gefunden. Strittmatter (1959 a) wies - in Einklang mit unseren Ergebnissen - bei L. casei und L. plantarum arabinosus methylenblauabhängige Laktatoxidation nach, desgleichen auch bei dem thermophilen Organismus L. delbrückii, der von uns nicht untersucht wurde.

Bei Berücksichtigung der Untersuchungen von Strittmatter ergibt sich, daß sowohl unter Thermo- wie unter Streptobakterien beide Typen des Laktatabbaus vertreten sind.

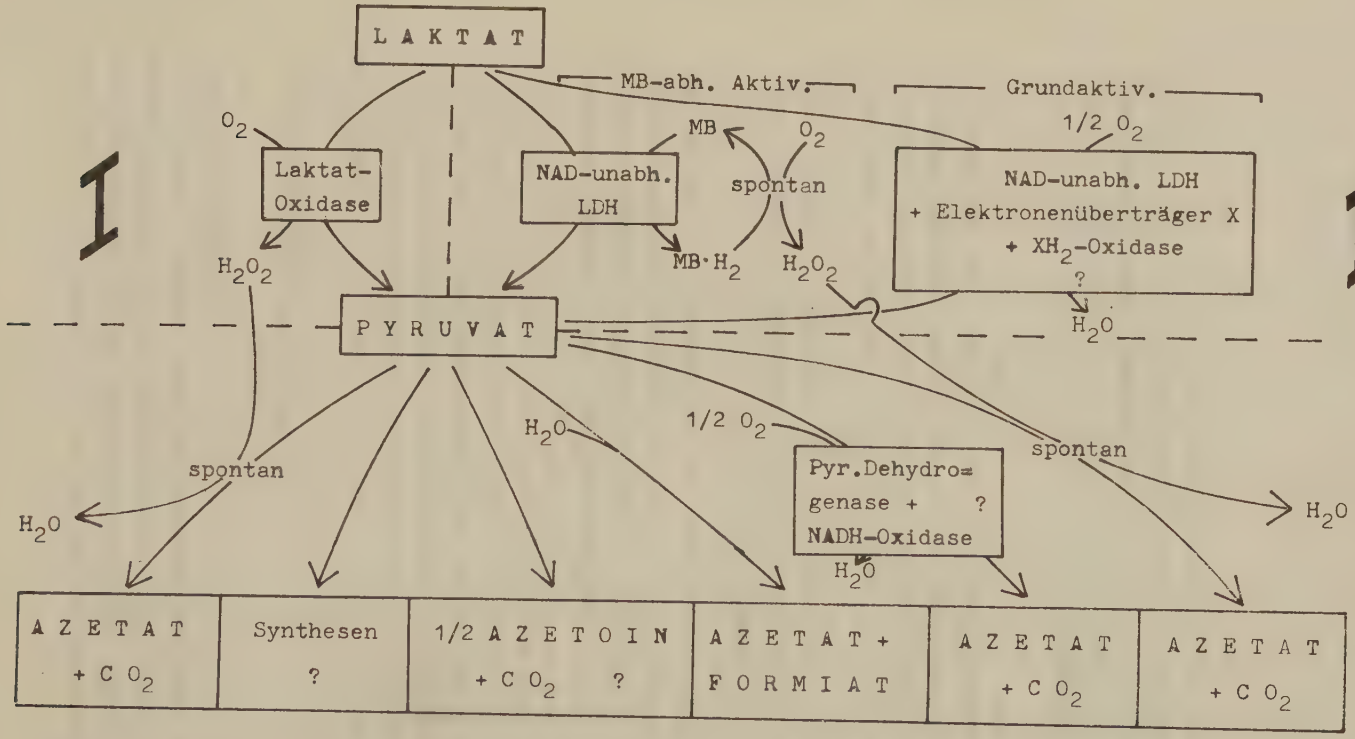

Abb. 27: Schematische Darstellung des Laktatabbaus bei den beiden Gruppen von Laktobazillen.

MB = Methylenblau

Nach unseren Ergebnissen läßt sich das in Abbildung 27 gezeigte Schema für die Laktatoxidation bei den beiden Gruppen aufstellen. Der Abbau unterscheidet sich bei den einzelnen Gruppen schon im ersten zu Pyruvat führenden Reaktionsschritt.

1.) Der Abbau ohne Methylenblauzusatz

a) Gruppe I:

L. curvatus, L. sake und wahrscheinlich auch die übrigen Vertreter dieser Gruppe besitzen Laktatoxidasen, welche die Elektronen des Laktats direkt auf O_2 übertragen können. Dabei entstehen Pyruvat und H_2O_2.

Der niedrige K_M für O_2 von ca. $5 \cdot 10^{-5}$ M, wie er ähnlich nur noch für die Xanthinoxidase (E.C.1.2.3.2.) und die Dihydroorotat-Dehydrogenase (E.C.1.3.3.1.) gefunden wurde (Enzyme Handbook) und der durchaus im Normalbereich liegende K_M für Laktat von $7 \cdot 10^{-4}$ M macht die rasche Oxidation des Laktats verständlich.

Die Enzyme sind L-spezifisch und, wie spektroskopische Untersuchungen zeigten, wahrscheinlich flavinhaltig.

Sie sind wohl am ehesten mit der bei Veillonella alcalescens gefundenen Pyruvat- und H_2O_2-bildenden L-Laktatoxidase vergleichbar, die jedoch im Gegensatz zu den hier gefundenen Enzymen membrangebunden ist (de Vries et al. 1978).

Wie eingangs erwähnt, besitzt auch L. delbrückii eine flavinhaltige Laktatoxidase, die jedoch nicht genauer untersucht wurde (Hager et al., 1954). Von der bei Mycobakterien gefundenen FMN-haltigen Laktatoxidase

(E.C.1.1.3.2.) wird das Laktat, im Gegensatz zu den Laktobazillen-Enzymen, nicht nur oxidiert, sondern auch decarboxyliert. Pyruvat und H_2O_2 treten nicht als freie Zwischenprodukte in Erscheinung, sondern bleiben am Enzym gebunden (Sutton, 1957; Lockridge et al., 1972).

b) Gruppe II:

Wie bereits erwähnt, ist bei Gruppe II, wenn kein Methylenblau zugesetzt wird, höchstens eine schwache Grundaktivität nachweisbar, die wohl kaum von physiologischer Bedeutung ist. Über den Mechanismus dieser schwachen direkten Laktatoxidation können wir nur Vermutungen anstellen (siehe auch unter 3.).

Bei der Oxidation entsteht kein H_2O_2. Offenbar übertragen die beteiligten sauerstoffreduzierenden Enzyme wie die Ascorbinsäureoxidase nicht zwei sondern vier Elektronen auf O_2.

Die NAD-abhängige Laktatdehydrogenase ist zumindest bei L. coryniformis, wahrscheinlich aber auch bei den übrigen Vertretern für den Laktatabbau nicht notwendig.

Die schlechte Affinität des laktatoxidierenden Enzym(system)s der Gruppe II ($K_M^{O_2} = 0{,}9 \cdot 10^{-3}$M bei L. plantarum bzw. $1{,}7 \cdot 10^{-3}$M bei L. coryniformis) erklärt die nur sehr schwache direkte Laktatoxidation bei diesen Organismen.

2.) Einfluß von Methylenblau auf den Laktatabbau

Die Laktatoxidase von L. curvatus und wahrscheinlich auch die der anderen Vertreter von Gruppe I reagiert nicht mit Methylenblau als Elektronenakzeptor.

Bei Gruppe II findet man dagegen laktatangreifende Enzyme von hoher Aktivität, die Redoxfarbstoffe als Elektronenakzeptor benutzen können und Laktat nach folgender Gleichung umsetzten:

$$\text{Laktat} + A \longrightarrow \text{Pyruvat} + AH_2$$

Es handelt sich also um NAD-unabhängige Laktatdehydrogenasen, und zwar bei allen hier untersuchten Organismen um D-spezifische.

Solche Enzyme sind bei vielen anderen Mikroorganismen, darunter auch bei einigen von uns untersuchten Laktobazillen gefunden worden, so bei L. plantarum (Snoswell, 1963; Gasser, 1970), L. casei (Mizushima und Kitahara, 1962; Stevenson, Holdsworth, 1973) und bei L. delbrückii (Gasser, 1970). Dieser Organismus, der von uns nicht untersucht wurde, hatte sich wie auch L. plantarum und L. casei in Versuchen von Strittmatter (1959 a) als methylenblauabhängig, also zu Gruppe II gehörend, erwiesen.

Das Vorkommen derartiger Laktatdehydrogenasen, die Farbstoffe sehr leicht zu reduzieren vermögen, ist also typisch für Gruppe II und erklärt die starke Förderung der Laktatoxidation durch Methylenblau bei diesen Organismen.

3.) Der natürliche Elektronenakzeptor der NAD-unabhängigen Laktatdehydrogenasen

Bei Gruppe II stellt sich die Frage, was der natürliche, das Methylenblau ersetzende Elektronenakzeptor für die NAD-unabhängige LDH sein könnte.

Während die Elektronen von membrangebundenen Laktatdehydrogenasen über cytochrom- und chinonhaltige Elektronentransportketten weitergeleitet werden (Nygaard, 1961; Kemp, 1972; de Vries et al., 1978), kennt man den natürlichen Akzeptor bei den löslichen Laktatdehydrogenasen bisher nicht.

Die Tatsache, daß O_2 die Synthese der NAD-unabhängigen LDH bei L. coryniformis fördert, spricht dafür, daß letztlich doch O_2 als Elektronenakzeptor fungiert. Doch ist es unwahrscheinlich, daß die Elektronenübertragung auf O_2 direkt durch die NAD-unabhängigen Laktatdehydrogenasen erfolgt, denn Untersuchungen von Mizushima und Kitahara (1962) und Snoswell (1963) zeigten an gereinigten Enzymen, daß diese nicht autoxidierbar sind.

Wir vermuten daher, daß die Elektronen des Laktats zunächst auf einen Zwischenträger X übertragen werden, von dem aus sie über spezielle $X \cdot H_2$-Oxidasen auf O_2 weitergeleitet werden. Ein solcher Elektronenüberträger könnte FAD sein, das sich in Untersuchungen von Strittmatter (1959 b) als stimulierend für die Laktatoxidation durch zellfreie Systeme aus L. casei erwiesen hatte.

Die Elektronen könnten von FAD aus direkt auf O_2 übertragen werden, oder zunächst über Diaphorasen auf NAD, das über NADH-Oxidasen reoxidiert werden könnte.

Unsere Untersuchungen lassen vermuten, daß reduziertes Methylenblau bei einigen Organismen außer durch die Spontanreaktion mit O_2 auch enzymatisch reoxidiert werden kann. Es wäre denkbar, daß die hierfür verantwortlichen Oxidasen auch den natürlichen Elektronenakzeptor beim Laktatabbau oxidieren.

Es ist demnach ein Abbauweg mit Beteiligung der NAD-unabhängigen LDH und Elektronenübertragung auf O_2 denkbar, und dieser ist möglicherweise in der bei den meisten Vertretern von Gruppe II gefundenen schwachen Grundaktivität, d.h. der langsamen Laktatoxidation ohne Methylenblauzusatz, verwirklicht.

Die Beschleunigung des Abbaus durch Methylenblau wäre dann entweder dadurch bedingt, daß die NAD-unabhängige LDH eine bessere Affinität zu Methylenblau als zum natürlichen Elektronenakzeptor X hat, oder daß Methylenblau wegen der höheren Konzentration diesen verdrängt.

Bei Gruppe II übertrifft die Fähigkeit, Laktat zu dehydrogenieren, offenbar bei weitem die Fähigkeit, den anfallenden Wasserstoff auf O_2 zu übertragen. Möglicherweise liegt hier ein regulatorisches Problem vor: vielleicht bedarf es einer Aktivierung der mit Sauerstoff reagierenden Enzyme durch besondere Metaboliten, die nur unter speziellen Bedingungen (etwa in einem besonderen Medium) gebildet werden und möglicherweise die Affinität zu O_2 erhöhen.

4. Produkte des Laktatabbaus

Das von beiden Gruppen zunächst gebildete Pyruvat ist Ausgangssubstrat für den weiteren Abbau. Bei einigen Vertretern von Gruppe II kann es sich jedoch während des Laktatabbaus offenbar stark anhäufen (insbesondere bei Zusatz von Methylenblau). Das ergibt sich aus dem im Vergleich zum Oxidationsgrad der Produkte teilweise sehr hohen O_2-Verbrauch.

Gruppe I setzt Pyruvat (unabhängig von Methylenblau) nahezu vollständig zu Azetat und CO_2 um, wenn der Laktatabbau durch ruhende Zellen im Puffer erfolgt. In Kulturmedium belassene Zellen von L. curvatus bilden jedoch weit weniger Azetat (und Pyruvat) als dem Laktatverbrauch in der stationären Phase entsprach. Offenbar werden unter diesen Bedingungen noch andere Produkte, vermutlich Azetoin, gebildet.

Einige Vertreter von Gruppe II bilden dagegen auch in Puffer nicht nur Azetat und CO_2, sondern wahrscheinlich daneben auch Azetoin bzw. Formiat. Das geht daraus hervor, daß bei einigen Organismen das Verhältnis von Azetat zu CO_2 weit unter 1, bzw. in anderen Fällen weit über 1 lag. Bei Zusatz von Methylenblau erhöhte sich der Anteil von Azetat und CO_2 an den Endprodukten jedoch sehr stark, was daraus hervorgeht, daß der Quotient Azetat/CO_2 sich 1 näherte.

Daß der Abbau von Pyruvat bei Gruppe I in Puffer auf die Decarboxylierung zu Azetat und CO_2 beschränkt ist, obwohl die Organismen wie einige Vertreter von Gruppe II offenbar Enzyme für mehrere Abbauwege besitzen, und daß diese Decarboxylierung bei Gruppe II durch Methylenblau so stark gefördert wird, stellt, so meinen wir, ein unphysiologisches Artefakt dar, wie im folgenden erläutert wird.

Pyruvat wird hier nämlich durch intermediär gebildetes H_2O_2 decarboxyliert. Diese Reaktion erfolgt sehr rasch, und zwar spontan, nicht etwa durch eine Pyruvatperoxidase katalysiert. Dies wurde bei L. curvatus gezeigt und gilt wahrscheinlich auch für alle anderen Organismen. Ob Pyruvat auch für andere Abbauwege nutzbar ist, hängt von der Geschwindigkeit dieser Spontanreaktion ab.

Bei Gruppe I entsteht durch die Wirkung der Laktatoxidase zwangsläufig neben Pyruvat auch H_2O_2. Bei den Abbauversuchen in Puffer waren die Zelldichte und damit auch die Konzentrationen an Pyruvat und H_2O_2 sehr viel höher als im Kulturmedium. Da die Geschwindigkeiten von Spontanreaktionen, insbesondere von bimolekularen, bei Zunahme der Substratkonzentration sehr viel stärker ansteigen können als die von enzymatischen Reaktionen, bei denen V_{max} nicht überschritten wird, ist es sehr gut möglich, daß enzymatische, Pyruvat-verbrauchende Reaktionen nur bei den in Kulturmedium belassenen Zellen (stationäre Phase) nicht dagegen bei den hochkonzentrierten Zellsuspensionen in Puffer zum Zuge kamen.

Beim Laktatabbau in Kulturmedium kommt möglicherweise hinzu, daß H_2O_2 mit einer Verbindung aus dem Medium spontan oder enzymatisch reagieren kann und dadurch der spontanen Decarboxylierungsreaktion entzogen wird. Denkbar wäre unter diesen Bedingungen auch eine Zerstörung des H_2O_2 durch eine NADH-Peroxidase, wie sie bei einigen Laktobazillen gefunden wurde (Brown, van Demark, 1968; Strittmatter, 1959 b; Yousten et al., 1975).

Bei Gruppe II wird während des langsamen, ohne Methylenblauzusatz erfolgenden Laktatabbaus kein H_2O_2 gebildet. Die spontane Decarboxylierung entfällt hier also, so daß andere enzymatische Reaktionen zum Tragen kommen. Die geringen von einigen Organismen produzierten Mengen Azetat und CO_2 werden wahrscheinlich über die Pyruvatdehydrogenase in Verbindung mit einer NADH-Oxidase gebildet.

In Gegenwart von Methylenblau entsteht jedoch H_2O_2 und zwar durch die spontane Reaktion des reduzierten Farbstoffes mit O_2. Der bei Zusatz von Methylenblau stark erhöhte Anteil von Azetat und CO_2 an den Produkten beruht also mindestens teilweise auf der spontanen Reaktion zwischen Pyruvat und H_2O_2. Bei L. xylosus, der ohne Methylenblauzusatz gar kein Azetat und CO_2 bildet, ist sogar anzunehmen, daß das in Gegenwart von Methylenblau gebildete Azetat und CO_2 alleine dieser spontanen Reaktion entstammt.

5.) Physiologische Aspekte der Laktatoxidation

a) Regulation der laktatoxidierenden Enzyme

O_2 erwies sich sowohl für die Synthese der L-Laktatoxidase von L.curvatus als auch der NAD-unabhängigen D- LDH von L.coryniformis als förderlich. Ähnliches ist für laktatoxidierende Enzyme von Sc. faecium (London, 1968) und Hefen gefunden worden (Nygaard, 1960 a,b).

Die spezifische Aktivität der Laktatoxidase von L.curvatus und der NAD-unabhängigen D-LDH von L. coryniformis nimmt (bei aerober Anzucht) mit dem Alter der Kultur stetig zu und erreicht in der stationären Phase einen maximalen Wert. (Bei L. coryniformis verschwindet die Aktivität sehr spät in der stationären Phase wieder, wahrscheinlich infolge einer allgemeinen Zellschädigung.)

Vermutlich wirkt das während des Wachstums gebildete Laktat induzierend auf die Synthese der Enzyme, wie es bei Aerobacter aerogenes (Pascal, Pichinoty, 1963), Pseudomonas aeruginosa (Kemp, 1972) und manchen Mycobakterien (Ratledge, 1976) der Fall ist. Eine negative Kontrolle durch Glucose,

wie sie bei Sc. faecium gefunden wurde (London, 1968), ist nicht anzunehmen, da auch nach Erreichen der stationären Phase im Medium noch Glucose vorhanden ist.

b) Funktion der Laktatoxidation

Die oben beschriebene Regulation der Synthese der laktatangreifenden Enzyme von L.curvatus und L.coryniformis ließ uns zunächst vermuten, daß sie den Organismen aerobes Wachstum auf Laktat ermöglichen würden. Das ist jedoch nicht der Fall. Die Organismen wachsen nicht auf Laktat (weder aerob noch anaerob) und auch das Wachstum auf Glucose wird durch O_2 nicht gefördert, sondern vielmehr gehemmt. Das gilt auch für die anderen von uns untersuchten Stämme.

Eine Ausnahme bildet lediglich L. plantarum 2o174, der auf Laktat schwaches aerobes Wachstum zeigte. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Yousten et al. (1975), wonach L. plantarum nach Verbrauch der Glucose aerob, aber nicht anaerob, noch weiterwachsen kann, wahrscheinlich auf Kosten des zunächst aus Glucose gebildeten Laktats. Dieses wird, wie wir annehmen, über die NAD-unabhängige Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, das unter Energiegewinn zu Azetat abgebaut wird.

Bei den anderen Organismen spielt der Laktatabbau für das Wachstum offenbar keine Rolle. Eine Kopplung der Laktatoxidation mit Transportvorgängen, wie sie bei E.coli gefunden wurde (Kaback, Milner, 197o), scheidet ebenfalls aus, da die laktatangreifenden Enzyme nicht membrangebunden sind.

Vielleicht ermöglichen diese Enzyme den Organismen die Nutzung von Laktat für Synthesen. Es wäre denkbar, daß Laktat über Pyruvat zu Azetyl-CoA abgebaut wird und daraus Fettsäuren synthetisiert werden. Dies wurde von Snoswell (1959) bereits für L. plantarum arabinosus diskutiert und würde sich mit dem Befund decken, daß wir bei L. curvatus nach aerobem Wachstum trotz des Verbrauchs von Laktat fast kein Azetat und Pyruvat als Produkte finden konnten.

Möglicherweise handelt es sich bei diesen Enzymen aber auch um Relikte einer früheren stammesgeschichtlichen Entwicklungsstufe, während der sie, wie heute beispielsweise noch bei Hefen, mit einer Elektronentransportkette gekoppelt waren. Wie Untersuchungen von Whittenbury (1964), Ritchey und Seely (1973, 1976) sowie van der Wiel-Korstanje und de Vries (1973) vermuten lassen, waren die Vorgänger der heutigen Milchsäurebakterien ja offenbar zur Synthese funktionsfähiger Cytochrome fähig, während die heutigen Formen nur noch das Apoenzym aufbauen können.

5. Zusammenfassung

1.) Alle hier untersuchten Laktobazillen (23 Stämme) konnten Laktat mehr oder weniger gut oxidativ abbauen. Doch ist die Fähigkeit zur direkten Elektronenübertragung auf O_2 unterschiedlich ausgeprägt und ließ eine Einteilung in zwei Gruppen zu:

Gruppe I:

Direkte Elektronenübertragung von Laktat auf O_2; keine Beeinflussung durch Methylenblau.

Gruppe II:

Methylenblau bewirkt eine starke Steigerung der Laktatoxidation, die ohne diesen Redoxvermittler gar nicht oder nur in geringem Ausmaß möglich ist.

Wo von einer Art verschiedene Stämme untersucht wurden, verhielten sich diese hinsichtlich ihrer Gruppenzugehörigkeit einheitlich. Zu Gruppe I gehören L. curvatus, L. sake, L. acidophilus, L. bulgaricus und L. lactis, zu Gruppe II L. plantarum, L. casei, L. coryniformis und L. xylosus.

2.) Als Produkte erscheinen in beiden Gruppen immer Azetat und CO_2, daneben können Pyruvat und wahrscheinlich auch Formiat und Azetoin auftreten.

3.) Zellsuspensionen und zellfreie Systeme von L. curvatus (DSM 2oolo) bauen Laktat fast vollständig unter Decarboxylierung nach folgender Gleichung ab:

$$\text{Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Azetat} + CO_2 + H_2O$$

Daneben entstehen Spuren von Pyruvat. Laktat wird nur unter aeroben Bedingungen abgebaut und bleibt unter anaeroben liegen. Der Abbau erfolgt in zwei Schritten. Zwischenprodukte sind Pyruvat und H_2O_2.

Der erste Schritt wird durch eine L-spezifische Laktatoxidase nach folgender Gleichung katalysiert:

$$\text{L-Laktat} + O_2 \longrightarrow \text{Pyruvat} + H_2O_2$$

Der Besitz einer Razemase ermöglichst auch den Abbau von D-Laktat.

Die Laktatoxidase wurde - u.a. über Affinitätschromatographie - 17-fach angereichert.

Das pH-Optimum für die Aktivität beträgt 6,3, der K_M für Laktat $7 \cdot 10^{-4}$M, für O_2 $5 \cdot 10^{-5}$M. ATP, ADP, Fructose-1,6-bisphosphat und Fructose-6-phosphat sowie KCN und Methylenblau sind ohne Einfluß auf die Aktivität. L-Alanin wird nicht umgesetzt. Spektroskopische Untersuchungen sprechen für ein Flavoprotein.

Der 2. Reaktionsschritt, die Decarboxylierung von Pyruvat durch H_2O_2, erfolgt wahrscheinlich spontan.

Die spezifische Aktivität der Laktatoxidase sowie die "Atmungsaktivität" der Zellsuspensionen ist bei

aeroben Wachstumsbedingungen sehr viel höher als bei anaeroben und steigt bei Belüftung mit dem Alter der Kultur an.

In der stationären Phase verschwindet bei aeroben Bedingungen Laktat aus dem Medium, doch entstehen weit weniger Azetat und Pyruvat als dem Laktatverbrauch entspricht. Unter diesen Bedingungen werden also größtenteils andere Produkte (Azetoin ?) gebildet.

4.) L. sake (Gruppe I) besitzt ebenfalls eine H_2O_2-bildende L-Laktatoxidase.

5.) Bei L. plantarum, L. coryniformis und L. casei (alle Gruppe II) ist weder eine D- noch eine L-spezifische, H_2O_2-bildende Laktatoxidase nachweisbar. Diese Organismen besitzen D-spezifische, NAD-unabhängige Laktatdehydrogenasen, die 2,6-Dichlorphenolindophenol als Elektronenakzeptor benützen können.

6.) Die NAD-unabhängige D-LDH von L. coryniformis setzt Laktat nach folgender Gleichung um:

$$\text{D-Laktat} + \text{DCIP} \longrightarrow \text{Pyruvat} + \text{DCIP} \cdot H_2$$

Das Enzym ist löslich und in Gegenwart von D-Laktat hitzestabil. Die spezifische Aktivität ist bei Aerobie höher als bei Anaerobie und steigt mit dem Alter der Kultur an.

7.) Die ohne Methylenblauzusatz in vitro erfolgende D-Laktatoxidation durch L. plantarum und L. coryniformis ist erst bei relativ hohen O_2-Konzentrationen halbgesättigt ($o,9 \cdot 1o^{-3}$M bzw. $1,7 \cdot 1o^{-3}$M).

Die "Atmungsaktivität" von L.coryniformis ist nicht membrangebunden. Auch nach Inaktivierung der NAD-abhängigen D-LDH von L. coryniformis ist in vitro Laktatoxidation unter O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung möglich. Während der Oxidation entsteht bei Methylenblauzusatz viel, ohne Methylenblau wenig Pyruvat.

8.) Belüftung verlängert bei L. coryniformis, L. casei pseudoplantarum und L. curvatus die Verdopplungszeit und senkt bei L. coryniformis, L. casei pseudoplantarum und wahrscheinlich auch bei L. curvatus den molaren ökonomischen Koeffizienten (Wachstum auf Glucose).

9.) L. plantarum (DSM 2o174) zeigte unter aeroben Bedindungen schwaches Wachstum auf Laktat.

Alle übrigen hier untersuchten Laktobazillen, darunter auch L. curvatus und L. coryniformis, konnten weder aerob noch anaerob auf Laktat wachsen.

6. Literatur

Abo-Elnaga, I.G., Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung Lactobacillus Beijerinck. I. Das Subgenus Streptobacterium Orla Jensen. Zbl.Bakt.Abt.II 119, 1-36 (1965).

Bergmeyer, H.U.: Glucose-Oxydase aus Schimmelpilzen. In: Methoden der enzymatischen AnalyseI(H.U. Bergmeyer), 416, Verlag Chemie (197o).

Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F., Stork, H.: Glucosebestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Methoden der enzymatischen Analyse II (H.U.Bergmeyer), 1163-1168, Verlag Chemie (197o).

Brown, J.P., van Demark, P.J.: Respiration of Lactobacillus casei. Can.J.Microbiol. 14, 829-835 (1968).

Christensen, M.D., Albury, M.N., Pederson, C.S.: Variation in the acetic acid - lactic acid ratio among the lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. 6, 316-318 (1958).

Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. J.Biol.Chem. 245, 3059-3065 (1970).

Dirar, H., Collins, E.B.: End-products, fermentation balances and molar growth yields of homofermentative lactobacilli. J.Gen.Microbiol. 73, 233-238 (1972).

Dirar, H., Collins, E.B.: Aerobic utilization of low concentrations of galactose by Lactobacillus plantarum. J.Gen.Microbiol. 78, 211-215 (1973).

Douglas, H.C.: Hydrogen peroxide in the metabolism of Lactobacillus brevis. J.Bact.54, 272 (1947).

Garvie, E.I.: Lactic dehydrogenases of strains of the genus Leuconostoc. J.Gen.Microbiol. 58, 85-94 (1969).

Gasser, F.: Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus Lactobacillus. J.Gen. Microbiol. 62, 223-239 (1970).

Green, A.A., Hughes, W.L.: Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: Methods in Enzymology I (J.M.Lowenstein), 67-78, Academic Press (1955).

Hager, L.P., Geller, D.M., Lipmann, F.: Flavoprotein-catalyzed pyruvate oxidation in Lactobacillus delbrückii. Federation Proceedings 13, 734-738 (1954).

Heil, A., Zillig, W.: Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS Lett. 11, 165-168 (1969).

Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K.O., Kandler, O.: Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from Lactobacillus casei ssp. casei and Lactobacillus curvatus. Arch.Microbiol. 112, 81-93 (1977 a).

Hensel, R., Mayr, U., Fujiki, H., Kandler, O.: Comparative studies of lactate dehydrogenases in lactic acid bacteria. Amino-acid composition of an active-site region and chemical properties of the L-lactate dehydrogenase of Lactobacillus casei, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus plantarum, and Lactobacillus acidophilus. Eur.J.Biochem.8o, 83-92 (1977 b).

Hohorst, H.J.: L-(+)-Lactat: Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse II, (H.U.Bergmeyer) 1425-1429, Verlag Chemie (197o).

Holz, G., Bergmeyer, H.U.: Azetat: Bestimmung mit Azetatkinase und Hydroxylamin. In: Methoden der enzymatischen Analyse II (H.U.Bergmeyer), 1486-149o, Verlag Chemie (197o).

Kaback, H.R., Milner, L.S.: Relationship of a membrane-bound D-(-)-lactic dehydrogenase to amino acid transport in isolated bacterial membrane preparations. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 66, 1008-1015 (1970).

Kandler, O.: Taxonomie und technologische Bedeutung der Gattung Lactobacillus Beijerinck. Zentr.Bl. Bakt.I, Orig., Suppl.Heft 2, 139-164 (1967).

Kaufmann, E., Dikstein, S.: A D-lactic dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides. Nature 190, 346 (1961).

Kemp, M.B.: D- and L-lactate dehydrogenases of Pseudomonas aeruginosa. Biochem.J. 130, 307-309 (1972).

Lineweaver, H., Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J.Amer.Chem.Soc.56, 658-666 (1934).

Lockridge, O., Massey, V., Sullivan, P.A.: Mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase. J.Biol.Chem. 247, 8097-8106 (1972).

London, J.: Regulation and function of lactate oxidation in Streptococcus faecium. J.Bact.95, 1380-1387 (1968).

de Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli.J.Appl.Bact.23, 130-135 (1960).

Manderson, G.J., Doelle, H.W.: The effect of oxygen and pH on the glucose metabolism of Lactobacillus casei var.rhamnosus ATCC 7469. Antonie van Leeuwenhook, J.Microbiol.Serol. 38, 223-240 (1972).

Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter Verlag Berlin (1968).

Mizushima, S., Kitahara, K.: Purification and properties of lactic dehydrogenase of Lactobacillus casei. J.Gen.Appl.Microbiol. 8, 13o-141 (1962).

Myers, F.W., Huang, K.-Y.: Thin-layer chromatography of citric acid cycle compounds. In: Methods in Enzymology 13 (J.M.Lowenstein), 431-434, Academic Press (1969).

Näser, K.H.: Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure. 11. Aufl., Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie (1969).

Neish, A.C.: Analytical methods for bacterial fermentations. National Research Council of Canada, 46-8-3, Saskatoon, 1-18 (1952).

Nygaard, A.P.: The formation of D- and L-lactic cytochrom c reductase during respiratory adaption in Saccharomyces cerevisiae. Arch.Biochem.Biophys. 86, 317 (196o a).

Nygaard, A.P.: D-lactic cytochrom c reductase of yeast, a possible intermediate in the biosynthesis of L-lactic cytochrom c reductase. Arch.Biochem. Biophys.87, 155-156 (196o b).

Nygaard, A.P.: D(-)-lactic cytochrome c reductase, a flavoprotein from yeast. J.Biol.Chem. 236, 92o-925 (1961).

O'Carra, P., Barry, S.: Affinity chromatography of lactate dehydrogenase. FEBS Lett. 21, 281-285 (1972).

Pascal, M.-C., Pichinoty, F.: Stéréospécificité et biosynthèse des lactate-déshydrogénases d'Aerobacter aerogenes. Biochim.Biophys.Acta 77, 507-509 (1963).

Patterson, M.S., Greene, R.C.: Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. Anal.Chem.37, 854-857 (1965).

Ratledge, C.: The physiology of the mycobacteria. VI. Aspects of metabolism. B: L-lactate oxidase. In: Advances in Microbial Physiology 13 (A.H.Rose, D.W.Tempest), 205-207, Academic Press (1976).

Rauen, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer (1964).

Ritchey, T.W., Seeley, H.W.: Cytochromes in Streptococcus faecalis var. zymogenes grown in a haematin-containing medium. J.Gen.Microbiol. 85, 220-228 (1974

Ritchey, T.W., Seeley, H.W.: Distribution of cytochrome-like respiration in streptococci. J.Gen.Microbiol. 93, 195-203 (1976).

Slater, E.C.: Flavins and flavoproteins. Elsevier Publishing Company (1966).

Snoswell, A.M.: Flavins of Lactobacillus arabinosus 17.5. A lactic dehydrogenase containing a flavin prosthetic group. Austral.J.Exp.Biol. 37, 49-64 (1959).

Snoswell, A.M.: Oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenases of Lactobacillus arabinosus 17.5. Biochim.Biophys.Acta 77, 7-19 (1963).

Spielmann, H., Erickson, R.P., Epstein, C.J.: The separation of lactate dehydrogenase X from other lactate dehydrogenase isoenzymes of mouse tests by affinity chromatography. FEBS Lett. 35, 19-23 (1973).

Stetter, K.O., Kandler, O.: Untersuchungen zur Entstehung von DL-Milchsäure bei Lactobacillen und Charakterisierung einer Milchsäureracemase bei einigen Arten der Untergattung Streptobacterium. Arch. Microbiol. 94, 221-247 (1973 a).

Stetter, K.O., Kandler, O.: Manganese requirement of the transcription processes in Lactobacillus curvatus. FEBS Lett. 36, 5-8 (1973 b).

Stetter, K.O.: Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerengemischen bei Laktobazillen. Dissertation, Technische Universität München (1973).

Stevenson, P.M., Holdsworth, E.S.: The distribution of NAD-independent lactic dehydrogenases amongst microorganisms. J.Gen.Microbiol. 78, 83-88 (1973).

Strittmatter, F.C.: Electron transport to oxygen in lactobacilli. J.Biol.Chem. 234, 2789-2793 (1959 a).

Strittmatter, F.C.: Flavin-linked oxidative enzymes of Lactobacillus casei. J.Biol.Chem. 234, 2794-2800 (1959 b).

Sutton, W.B.: Isolation and properties of a lactic oxidative decarboxylase from Macobacterium phlei. J.Biol. Chem. 21o, 3o9-32o (1954).

Sutton, W.B.: Sulfhydryl and prosthetic groups of lactic oxidative decarboxylase from Mycobacterium phlei. J.Biol.Chem. 216, 749-761 (1955).

Sutton, W.B.: Mechanism of action and chrystallization of lactic oxidative decarboxylase from Mycobacterium phlei. J.Biol.Chem. 226, 395-4o5 (1957).

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.F.: Manometric Techniques. Burgess Publishing Company (1964).

Varner, J.E.: Chromatographic analyses of organic acids. In: Methods in Enzymology 3 (J.M.Lowenstein), 397-4o2, Academic Press (1957).

de Vries, W., Kapteijn, W.M.C., van der Beek, E.G., Stouthammer, A.H.: Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L 3 in batch cultures and in continuous cultures. J.Gen.Microbiol. 63, 333-345 (197o).

de Vries, W., Donkers, C., Boellaard, M., Stouthammer, A.H.: Oxygen metabolism by the anaerobic bacterium Veillonella alcalescens. Arch.Microbiol. 119, 167-174 (1978).

Whittenbury, R.: Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J.Gen. Microbiol. 35, 13-26 (1964).

van der Wiel-Korstanje, J.A.A., de Vries, W.: Cytochrome synthesis by Bifidobacterium during growth in media supplemented with blood. J.Gen.Microbiol. 75, 417-419 (1973).

Wiesenberg, E.: Die mikroanalytische Bestimmung von C-Methyl- und Azetylgruppen. Mikrochemie 33, 51 (1948).

Yousten, A.A., Johnson, J.L., Salin, M.: Oxygen metabolism of catalase-negative and catalase-positive strains of Lactobacillus plantarum. J.Bact. 123, 242-247 (1975).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Professor Dr.O.Kandler von 1975 bis 1979 angefertigt.

Herrn Prof.Dr.O.Kandler danke ich für das rege Interesse an meiner Arbeit, die vielseitigen Anregungen und wertvollen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich Herrn Priv.Dozent Dr.K.Stetter für seine Anteilnahme und wertvollen Hinweise danken.

Mein Dank gilt nicht zuletzt allen kollegialen Mitarbeitern des Botanischen Instituts.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Margaretha Martha Hoechst
Geburtsdatum	8.1.1950
Geburtsort	Hallein
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1956 - 1960 Volksschule Simmern
1960 - 1968 Staatliches Herzog-Johann-Gymnasium Simmern
Juni 1968 Abitur

Studium:

1968 - 1975 Studium der Biologie an der Universität München
Febr. 1975 Diplomprüfung

Promotion:

1975 - 1979 Promotion am Lehrstuhl für Botanik der Universität München unter Leitung von Prof.Dr.O.Kandler
1975 - 1978 Stipendium bzw. Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
1978 - 1979 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz